VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

Л.Страйер

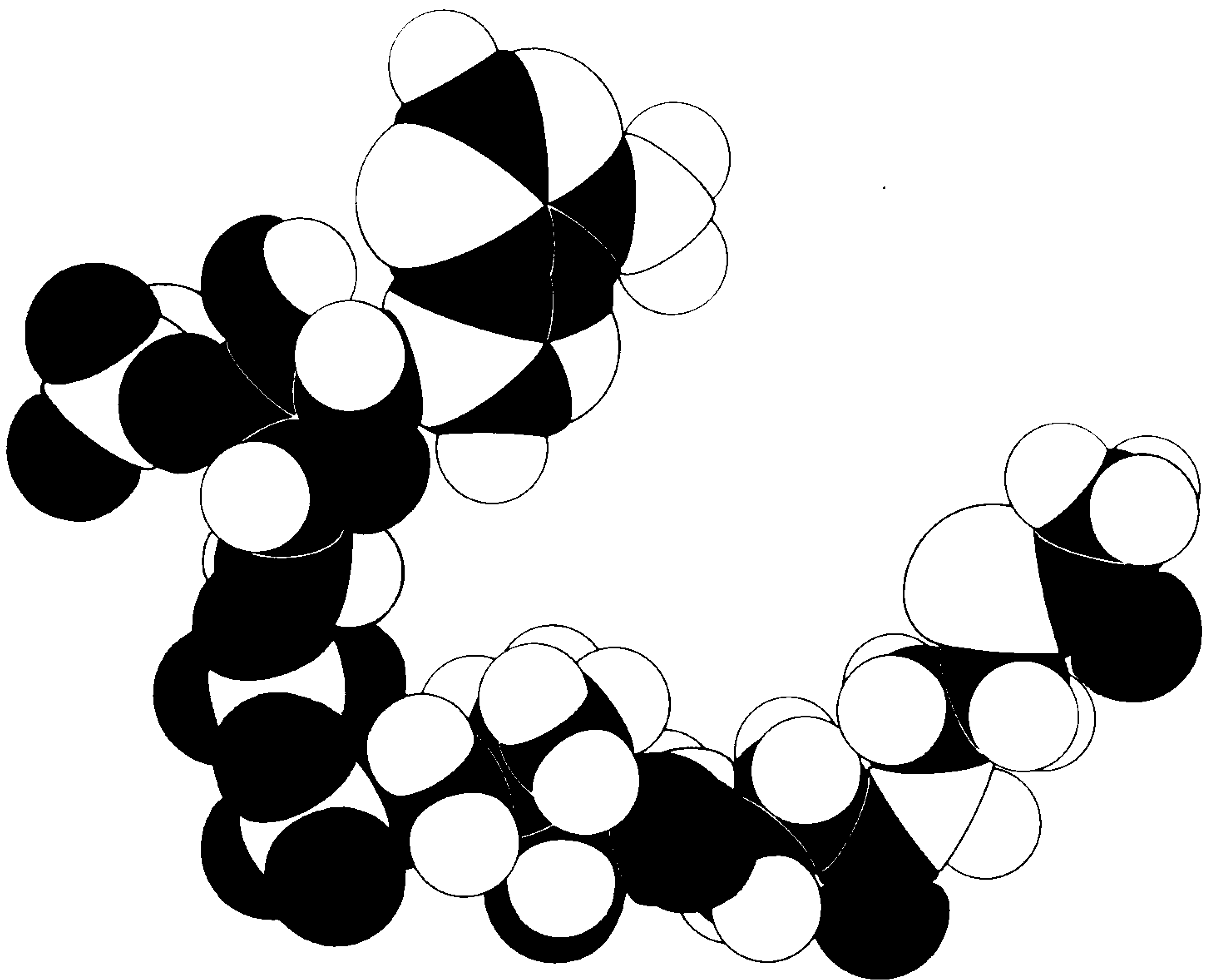
БИОХИМИЯ

Second Edition

BIOCHEMISTRY

Lubert Stryer
Stanford University

W.H.Freeman and Company
San Francisco



Л. Страйер

В 3-х томах

БИОХИМИЯ

Перевод с английского канд. биол. наук Р. Б. Капнер
и канд. биол. наук А. М. Колчинского

Под редакцией академика С. Е. Северина

том 2

Москва «Мир»
1985

ББК 28.072
С-83
УДК 577.1

Страйер Л.

С-83 Биохимия: В 3-х т. Т. 2. Пер. с англ.– М.: Мир, 1985.– Т. 2–312 с., ил.

В книге ученого из США на самом современном научном уровне рассмотрены основные проблемы биохимии и молекулярной биологии.

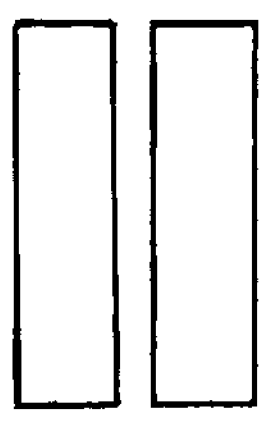
Во втором томе рассматриваются процессы генерирования, превращения и хранения энергии в клетке, а также биосинтез липидов, аминокислот и нуклеотидов.

Предназначена для биохимиков, молекулярных биологов, физиологов, химиков, медиков, для студентов, аспирантов и преподавателей биологических, химических и медицинских специальностей.

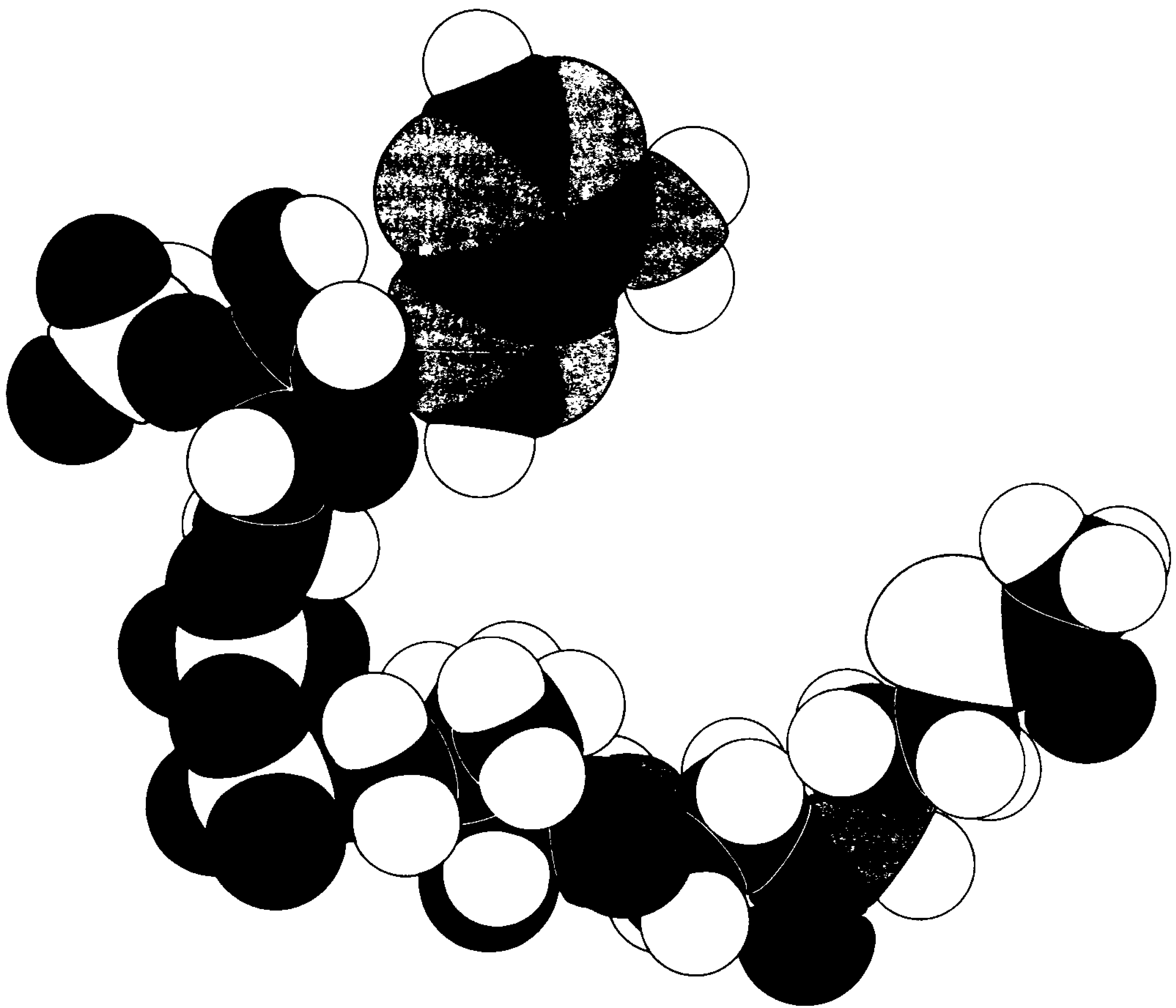
С $\frac{2001040000-271}{041(01)-85}$ св. пл. подп. изд., 1984 **ББК 28.072**

Редакция литературы по биологии

© 1975, 1981 by Lubert Stryer
© Перевод на русский язык, «Мир», 1985

Часть II 

Генерирование и хранение метаболической энергии



Модель ацетилкофермента А, ключевого промежуточного продукта при генерировании метаболической энергии.

ГЛАВА 11

Метаболизм: основные положения и обозначения

Концепции конформации и динамики, развитые в части I, в особенности аспекты, касающиеся специфичности и каталитической мощности ферментов, регуляции их каталитической активности и образования компартментов (обособленных участков, отсеков) мембранами позволяют нам теперь обратиться к двум главным вопросам биохимии:

1. Каким образом клетки извлекают энергию и восстановительную способность из окружающей среды?

2. Каким образом клетки синтезируют строительные блоки своих макромолекул?

Эти процессы осуществляются высокоинтегрированной системой химических реакций, составляющих в совокупности *метаболизм*, или *обмен веществ.*

Даже у такого простого организма, как *E. coli*, насчитывается по меньшей мере тысяча различных химических реакций. Упорядочение этих реакций может на первый взгляд показаться недостижимым. Однако при более глубоком анализе оказывается, что метаболизм представляет собой *согласованную систему явлений со множеством общих мотивов.* Число реакций метаболизма велико, но число *видов* этих реакций относительно мало. Их механизм обычно совсем прост. Например, двойная связь часто образуется в результате реакции дегидратации. Далее, центральную роль во всех формах жизни играет группа молекул, общее число которых составляет примерно сто. Более того, существуют общие механизмы регуляции метаболических путей. Цель данной главы – описать некоторые общие принципы и мотивы метаболизма.

11.1. Свободная энергия – самая полезная термодинамическая функция в биохимии

Сначала вспомним некоторые положения термодинамики, имеющие важное значение для понимания процессов обмена веществ. В термодинамике *система* – это совокупность предметов внутри определенной области. Все остающееся за пределами этой области и находящееся в остальной части пространства обозначается как *окружающая среда. Первый закон термодинамики гласит, что общая энергия системы и окружающей среды – величина постоянная.* Иными словами, энергия сохраняется. Математическое выражение первого закона термодинамики имеет следующий вид:

$$\Delta E = E_B - E_A = Q - W, \qquad (1)$$

где E_A – энергия системы в начале процесса, а E_B – энергия в конце процесса; Q – тепло, поглощаемое системой; W – работа, совершаемая системой. В уравнении (1) следует обратить внимание на тот важный факт, что *изменение энергии системы зависит только от начального и конечного состояний и не зависит от пути превращения.*

Первый закон термодинамики не дает возможности предсказать, может ли та или иная реакция протекать спонтанно. Некоторые реакции все же идут спонтанно, несмотря на положительное значение ΔE. При этом система поглощает тепло из окружающей среды, так что суммарная энергия системы и окружающей среды остается постоянной. Очевидно, в этих случаях для предсказания спонтанности процесса требуется функция, отличная от ΔE. Одной из таких функций является *энтропия* (S), которая служит мерой *степени беспорядочности или разупорядоченности системы.* Энтропия системы возрастает (ΔS

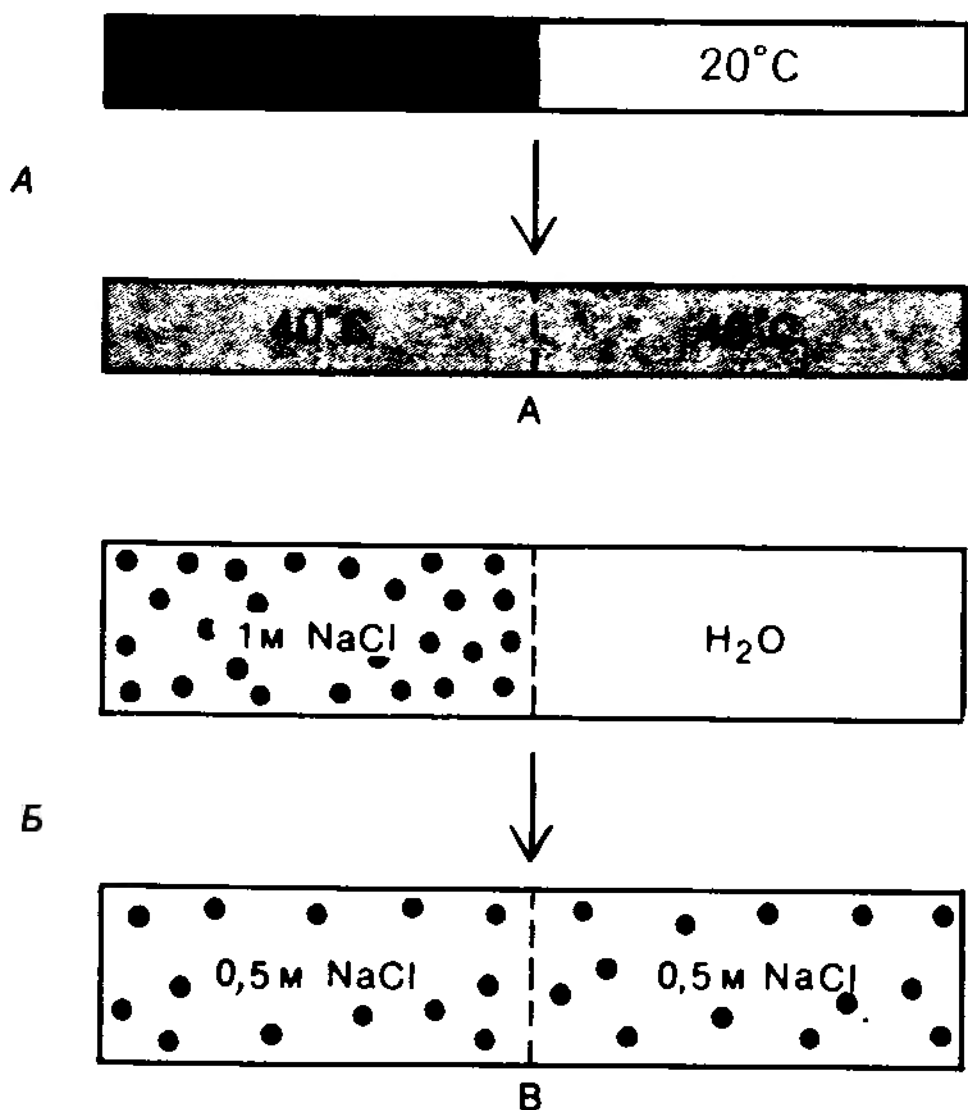


Рис. 11.1. Примеры процессов, которые индуцируются при повышении энтропии системы: *А* – диффузия тепла; *Б* – диффузия растворенных веществ.

имеет положительное значение), когда увеличивается степень разупорядоченности. *Второй закон термодинамики гласит, что процесс может протекать спонтанно только при условии увеличения суммы энтропий системы и окружающей среды*

$(\Delta S_{системы} + \Delta S_{среды}) > 0$ для

спонтанного процесса. (2)

Следует обратить внимание на следующий факт: во время спонтанного процесса энтропия системы может уменьшаться при условии, что энтропия окружающей среды увеличивается, так что их сумма оказывается положительной величиной. Например, образование высокоупорядоченной биологической структуры термодинамически возможно, поскольку снижение энтропии в такой системе более чем возмещается повышением энтропии окружающей среды.

Одна из трудностей использования энтропии в качестве критерия возможности спонтанного протекания биохимического процесса состоит в том, что изменения энтропии при химических реакциях измерить нелегко. Кроме того, критерий спонтанности, даваемый уравнением (2), требует, чтобы было известно изменение энтропии и окружающей среды и исследуемой системы. Эти трудности устраняются при использовании другой термодинамической функции, называемой *свободной энергией*, которая обозначается символом G (или F в более ранних источниках). В 1878 г. Джошуа Виллард Гиббс (Josiah Willard Gibbs) построил функцию свободной энергии путем сочетания первого и второго законов термодинамики. Основное уравнение при этом следующее:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \qquad (3)$$

где ΔG – изменение свободной энергии системы, претерпевающей трансформацию при постоянных давлении (P) и температуре (T), ΔH – изменение энтальпии системы, а ΔS – изменение энтропии этой системы. Следует отметить, что никакие параметры окружающей среды не входят в это уравнение. Изменение энтальпии вычисляется из уравнения

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V. \qquad (4)$$

Изменение объема ΔV мало почти для всех биохимических реакций, а это значит, что ΔH почти равно ΔE. Отсюда

$$\Delta G \simeq \Delta E - T\Delta S. \qquad (5)$$

Таким образом, ΔG реакции зависит как от изменения внутренней энергии, так и от изменения энтропии системы.

Изменение свободной энергии (ΔG) реакции в отличие от изменения внутренней энергии (ΔE) служит ценным критерием возможности спонтанного протекания этой реакции.

1. *Реакция может идти спонтанно только при отрицательном значении* ΔG.

2. Система находится в равновесии и не претерпевает никаких изменений, когда ΔG равно нулю.

3. Реакция не может идти спонтанно при положительном значении ΔG. Для индукции такой реакции требуется приток свободной энергии.

Здесь необходимо подчеркнуть еще два дополнительных момента. Во-первых, ΔG реакции зависит только от разности: свободная энергия продуктов (конечное со-

Единицы энергии –

Калория (кал) эквивалентна такому количеству тепла, которое требуется для повышения температуры 1 г воды с 14,5 до 15,5°С.
Килокалория (ккал) равна 1000 кал.
Джоуль (Дж) – количество энергии, необходимое для приложения силы в 1 Н на расстоянии 1 м.
Килоджоуль (кДж) равен 1000 Дж.
1 ккал = 4,184 кДж.

стояние) минус свободная энергия реагирующих веществ (начальное состояние). ΔG *реакции не зависит от пути превращения.* Механизм реакции не оказывает влияния на ΔG. Например, значение ΔG для окисления глюкозы до CO_2 и H_2O остается одним и тем же вне зависимости от того, осуществляется ли это превращение путем сгорания in vitro или же в результате серии многих ферментативных реакций в клетке. Во-вторых, ΔG *не дает информации о скорости реакции.* Отрицательное значение ΔG указывает, что данная реакция может протекать спонтанно, однако это еще не значит, что она будет идти с заметной скоростью. Как обсуждалось ранее (разд. 6.6), скорость реакции зависит от *свободной энергии активации* ($\Delta G^{\neq}$), которая не связана с ΔG.

11.2. Изменение стандартной свободной энергии реакции и его связь с константой равновесия

Рассмотрим реакцию



$$A + B \rightleftharpoons C + D.$$

ΔG этой реакции дается уравнением

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT\ln\frac{[C][D]}{[A][B]}, \qquad (6)$$

где ΔG^0 – *изменение стандартной свободной энергии*, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, [A], [B], [C] и [D] – молярные концентрации (точнее активности) реагирующих веществ. ΔG^0 – изменение свободной энергии реакции при стандартных условиях, когда каждое из реагирующих веществ A, B, C и D присутствует в концентрации 1,0 М. Таким образом, ΔG реакции зависит от *природы* реагирующих веществ [охарактеризованной с помощью ΔG^0 в уравнении (6)] и от их *концентрации* [выраженной как логарифмическая функция в уравнении (6)].

Для упрощения расчетов по изменению свободной энергии при биохимических реакциях условно принято считать, что стандартное состояние – это состояние при pH 7. Отсюда активность H^+, соответствующая pH 7 в уравнениях (6) и (9), равна 1. Активность воды в этих уравнениях также принята равной 1. В данной книге будет фигурировать понятие *изменения стандартной свободной энергии при pH 7*, обозначаемое как $\Delta G^{0'}$. В качестве единицы энергии будет использоваться *килокалория (ккал).*

Можно легко вывести соотношение между стандартной свободной энергией и константой равновесия реакции. В состоянии равновесия $\Delta G = 0$. Уравнение (6) тогда приобретает следующий вид:

$$0 = \Delta G^{0'} + RT\ln\frac{[C][D]}{[A][B]}, \qquad (7)$$

и тогда

$$\Delta G^{0'} = -RT\ln\frac{[C][D]}{[A][B]}. \qquad (8)$$

Константа равновесия при стандартных условиях, K'_{eq}, определяется следующим образом:

$$K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}. \qquad (9)$$

Вставляя уравнение (9) в уравнение (8), получаем

$$\Delta G^{0'} = -RT\ln K'_{eq}, \qquad (10)$$

$$\Delta G^{0'} = -2{,}303RT\lg K'_{eq}. \qquad (11)$$

Преобразуя последнее уравнение, получаем

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{0'}/(2{,}303RT)} \qquad (12)$$

Подставив вместо R и T их значения – соответственно $1{,}98 \cdot 10^{-3}$ ккал·моль$^{-1}$ × × град$^{-1}$ и $T = 298$ К (25°С), – получим

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{0\prime}/1{,}36}, \qquad (13)$$

где $\Delta G^{0\prime}$ выражено в ккал/моль. Таким образом, стандартная свободная энергия и константа равновесия реакции связаны между собой простым выражением. Например, константа равновесия 10 соответствует изменению стандартной свободной энергии –1,36 ккал/моль при 25°С (табл. 11.1).

В качестве примера вычислим $\Delta G^{0\prime}$ и ΔG для изомеризации дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат. Эта реакция идет при гликолизе (гл. 12). В состоянии равновесия отношение концентрации глицеральдегид-3-фосфата к концентрации дигидроксиацетонфосфата при 25°С (298 К) и pH 7 составляет 0,0475. Изменение стандартной свободной энергии для этой реакции рассчитывается из уравнения (11):

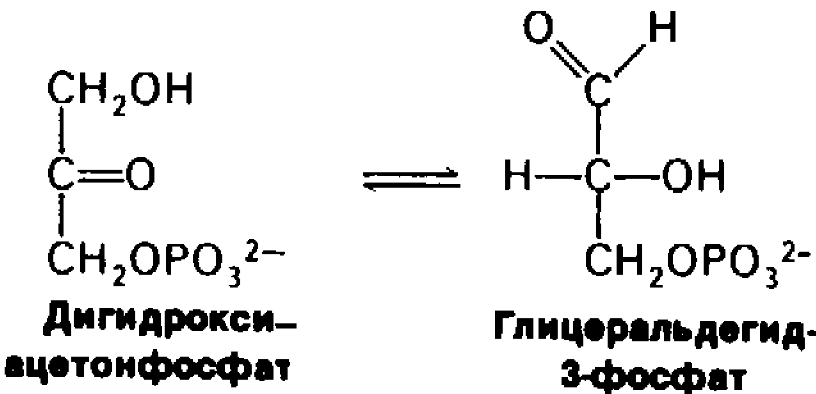
$$\Delta G^{0\prime} = -2{,}303RT \lg K'_{eq}$$
$$= -2{,}303 \cdot 1{,}98 \cdot 10^{-3} \cdot 298 \cdot \lg 0{,}0475$$
$$= +1{,}8 \text{ ккал/моль}.$$

Теперь вычислим ΔG для этой реакции, когда начальная концентрация дигидроксиацетонфосфата равна $2 \cdot 10^{-4}$ М и начальная концентрация глицеральдегид-3-фосфата – $3 \cdot 10^{-6}$ М. Подставляя эти величины в уравнение (6), получаем

$$\Delta G = 1{,}8 \text{ ккал/моль} + 2{,}303\, RT \lg \frac{3 \cdot 10^{-6} \text{ М}}{2 \cdot 10^{-4} \text{ М}}$$
$$= 1{,}8 \text{ ккал/моль} - 2{,}5 \text{ ккал/моль}$$
$$= -0{,}7 \text{ ккал/моль}.$$

Таблица 11.1. **Связь между $\Delta G^{0\prime}$ и K'_{eq} (при 25 С)**

K'_{eq}	$\Delta G^{0\prime}$, ккал/моль	K'_{eq}	$\Delta G^{0\prime}$, ккал/моль
10^{-5}	6,82	10	–1,36
10^{-4}	5,46	10^2	–2,73
10^{-3}	4,09	10^3	–4,09
10^{-2}	2,73	10^4	–5,46
10^{-1}	1,36	10^5	–6,82
1	0		



Отрицательное значение для ΔG указывает, что изомеризация дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат может протекать спонтанно, когда эти соединения присутствуют в указанных выше концентрациях. Отметим, что ΔG для этой реакции имеет отрицательное значение, хотя $\Delta G^{0\prime}$ положительно. *Важно подчеркнуть, что соотношение величин ΔG и $\Delta G^{0\prime}$ для реакции (ΔG больше, меньше или равно $\Delta G^{0\prime}$) зависит от концентрации реагирующих веществ. Критерием спонтанности реакции служит значение ΔG, а не $\Delta G^{0\prime}$.*

11.3. Термодинамически невыгодная реакция может быть индуцирована термодинамически выгодной реакцией

Важное значение в термодинамике имеет тот факт, что *общее изменение свободной энергии для ряда реакций равно сумме изменений свободной энергии на отдельных этапах*. Рассмотрим реакции

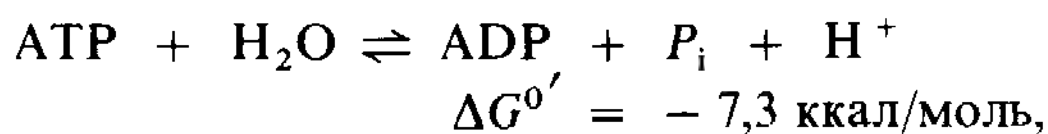
$A \rightleftharpoons B + C$	$\Delta G^{0\prime} = +5$ ккал/моль
$B \rightleftharpoons D$	$\Delta G^{0\prime} = -8$ ккал/моль
$A \rightleftharpoons C + D$	$\Delta G^{0\prime} = -3$ ккал/моль

При стандартных условиях А не может спонтанно превращаться в В и С, поскольку ΔG имеет положительное значение. Однако превращение В в D при стандартных условиях термодинамически возможно. Поскольку изменения свободной энергии аддитивны, $\Delta G^{0\prime}$ для превращения А в С и D составляет –3 ккал/моль. Следовательно, при стандартных условиях это превращение может протекать спонтанно. Таким образом, *термодинамически невыгодная реакция может быть индуцирована термодинамически выгодной реакцией*. Эти реакции *сопрягаются* при посредстве В, их общего промежуточного продукта. Мы встретимся со многими случаями сопряжения энергии в процессах обмена веществ.

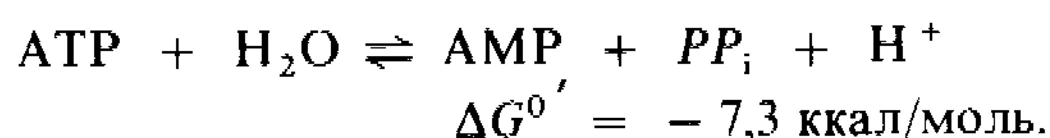
11.4. АТР – универсальная энергетическая валюта в биологических системах

Живые существа нуждаются в постоянном притоке свободной энергии для выполнения трех основных задач: 1) для преобразования механической работы в мышечное сокращение и другие формы клеточных движений, 2) для активного транспорта молекул и ионов и 3) для синтеза макромолекул, а также других биомолекул из простых предшественников. Используемая в этих процессах свободная энергия, которая поддерживает организм в состоянии, далеком от равновесия, поступает из окружающей среды. *Хемотрофы* получают эту энергию путем окисления пищевых веществ, тогда как *фототрофы* получают ее, улавливая световую энергию. Свободная энергия, высвобождающаяся при окислении питательных веществ и извлекаемая из световой энергии, прежде чем быть использованной в процессах движения, активного транспорта и биосинтеза, частично преобразуется в специальную форму. Таким специальным носителем свободной энергии, своего рода энергетической валютой, является *аденозинтрифосфат* (АТР). Центральную роль АТР в обмене энергии в биологических системах раскрыли Фриц Липман и Герман Калькар (Fritz Lipmann, Herman Kalkar) в 1941 г.

АТР – нуклеотид, состоящий из остатков аденина, рибозы и трифосфата (рис. 11.2; обсуждение номенклатуры нуклеотидов см. в разд. 22.1). Активная форма АТР – это обычно комплекс АТР с Mg^{2+} или Mn^{2+}. Говоря о роли АТР как носителя энергии, мы фокусируем внимание на ее трифосфатном компоненте. *АТР – молекула, богатая энергией, поскольку ее трифосфатный компонент содержит две фосфоангидридные связи.* При гидролизе АТР до аденозиндифосфата (ADP) и ортофосфата (P_i) или до аденозинмонофосфата (АМР) и пирофосфата (PP_i) высвобождается большое количество свободной энергии. $\Delta G^{0'}$ для этих реакций зависит от ионной силы среды и от концентрации Mg^{2+} и Ca^{2+}. Мы будем использовать величину – 7,3 ккал/моль. При условиях, существующих в клетке в норме, фактическое значение ΔG для этих процессов гидролиза составляет около – 12 ккал/моль.



$$\text{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \text{ADP} + P_i + H^+ \qquad \Delta G^{0'} = -7{,}3 \text{ ккал/моль},$$



$$\text{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \text{AMP} + PP_i + H^+ \qquad \Delta G^{0'} = -7{,}3 \text{ ккал/моль}.$$

АТР, АМР и ADP могут превращаться друг в друга. Фермент аденилаткиназа (называемый также миокиназой) катализирует реакцию



$$\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{ADP}.$$

Свободная энергия, высвобождающаяся при гидролитическом расщеплении ангидридной связи АТР, используется для запуска реакций, требующих притока свободной энергии, например при мышечном сокращении. АТР в свою очередь образуется из ADP и P_i при окислении топливных молекул у хемотрофов или при утилизации света у фототрофов. *Этот цикл АТР - ADP представляет собой основной механизм обмена энергии в биологических системах.*

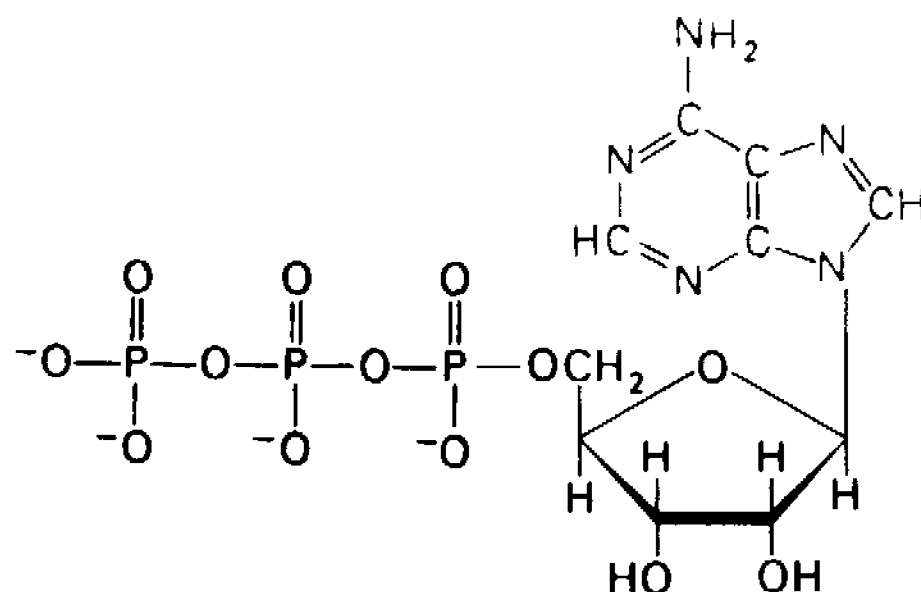
Некоторые биосинтетические реакции запускаются нуклеотидами – аналогами АТР, а именно: гуанозинтрифосфатом (GTP), уридинтрифосфатом (UTP) и цитидинтрифосфатом (СТР). Дифосфатные формы этих нуклеотидов обозначаются соответственно как GDP, UDP и CDP. Ферменты катализируют перенос концевой фосфорильной группы от одного нуклеотида к другому:



$$\text{ATP} + \text{GDP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{GTP},$$



$$\text{ATP} + \text{GMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{GDP}.$$



Аденозинтрифосфат (АТР)

Рис. 11.2. Аденозинтрифосфат состоит из остатков аденина (синий цвет), рибозы (желтый цвет) и трифосфата (красный цвет).

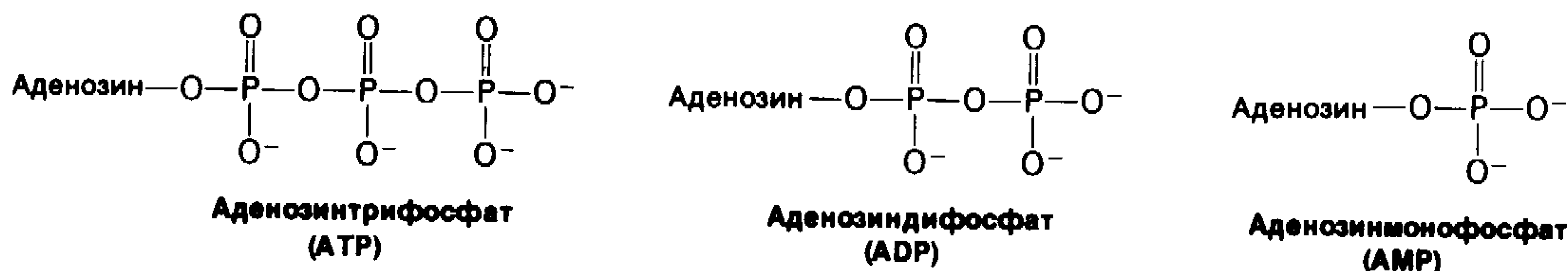


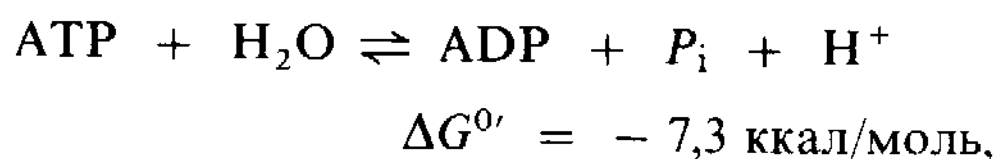
Рис. 11.3. Строение ATP, ADP и AMP. (Аденозин состоит из аденина, связанного с рибозой.)

11.5. ATP постоянно образуется и потребляется

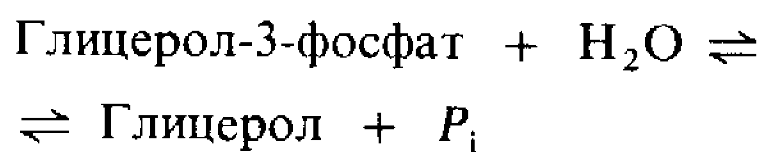
ATP является главным *непосредственно используемым донором свободной энергии* в биологических системах, а не формой запасания свободной энергии. В обычной клетке молекула ATP расходуется в течение одной минуты после ее образования. *Оборот ATP очень высок.* Например, человек в покое расходует около 40 кг ATP за 24 ч. Во время интенсивных упражнений скорость использования ATP может достигать 0,5 кг/мин. Движение, активный транспорт, усиление сигнала и процессы биосинтеза могут происходить только при условии непрерывного регенерирования ATP из ADP (рис. 11.4). Фототрофы для генерирования ATP извлекают свободную энергию из солнечного света, тогда как хемотрофы образуют ATP при окислении молекул, выполняющих роль топлива.

11.6. Структурная основа ATP, определяющая высокий потенциал переноса групп

Сравним стандартную свободную энергию гидролиза ATP со свободной энергией гидролиза такого фосфорного эфира, как глицерол-3-фосфат:

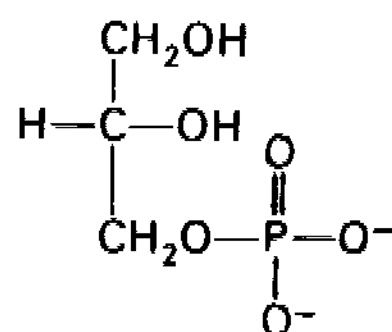


$$\mathrm{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \mathrm{ADP} + P_i + H^+ \qquad \Delta G^{0\prime} = -7{,}3\ \text{ккал/моль},$$



$$\text{Глицерол-3-фосфат} + H_2O \rightleftharpoons \text{Глицерол} + P_i \qquad \Delta G^{0\prime} = -2{,}2\ \text{ккал/моль}.$$

Значение $\Delta G^{0\prime}$ для гидролиза глицерол-3-фосфата значительно меньше, чем для гидролиза ATP. Это означает, что ATP имеет более сильно выраженную тенденцию к переносу концевой фосфорильной группы на молекулу воды, чем глицерол-3-фосфат. Иными словами, ATP обладает более высоким *потенциалом переноса фосфатных групп*, чем глицерол-3-фосфат.



Глицерол-3-фосфат

Какова структурная основа присущего ATP высокого потенциала переноса фосфатной группы? Чтобы ответить на этот вопрос, следует проанализировать структуру ATP и продуктов его гидролиза ADP и P_i, потому что $\Delta G^{0\prime}$ зависит от *разности* свободной энергии продуктов реакции и вступающих в нее соединений. Доказана важная роль двух факторов в этом аспекте: *электростатического отталкивания* и *резонансной стабилизации*. При pH 7 трифосфатный компонент ATP несет около четырех отрицательных зарядов. Эти заряды сильно взаимоотталкиваются, поскольку они находятся в тесной близости друг к другу. *Электростатическое отталкивание между указанными отрицательно заряженными группами ослабляется при гидролизе ATP. Другой фактор,*

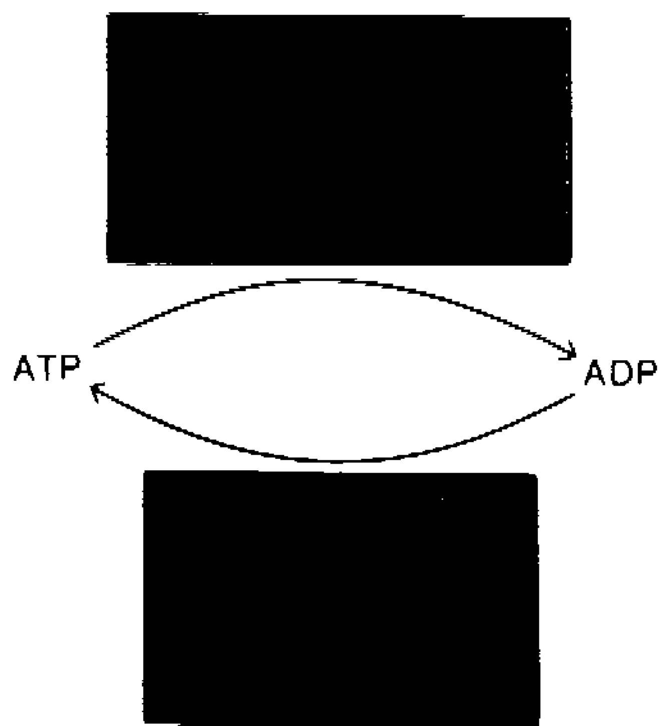


Рис. 11.4. Цикл ATP–ADP – основной механизм обмена энергии в биологических системах.

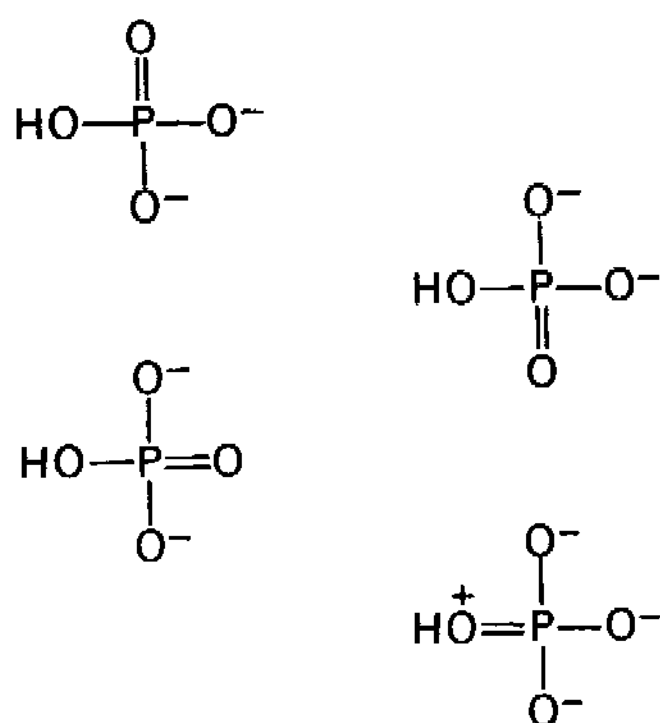


Рис. 11.5. Значимые резонансные формы ортофосфата.

обусловливающий высокий потенциал переноса групп, которым обладает ATP,– это бо́льшая резонансная стабилизация для ADP и P_i, *чем для ATP.* Например, ортофосфат имеет определенное число резонансных форм с одинаковой энергией (рис. 11.5). В противоположность ему концевой отрезок ATP имеет меньшее количество значимых резонансных форм в расчете на одну фосфатную группу. Резонансные формы такого типа, который показан на рис. 11.6, вряд ли существуют, поскольку в этом случае два атома фосфора будут конкурировать за электронные пары на кислороде. Кроме того, электростатически неблагоприятным является расположение положительного заряда на кислороде в близком соседстве с положительно заряженным атомом фосфора.

Различные другие соединения в биологических системах имеют высокий потенциал переноса фосфатной группы. Некоторые из них, такие, как фосфоенолпируват, ацетилфосфат и креатинфосфат (рис. 11.7), обладают более высоким потенциалом переноса фосфатной группы, чем ATP. Это означает, что фосфоенолпируват может переносить свою фосфорильную группу на

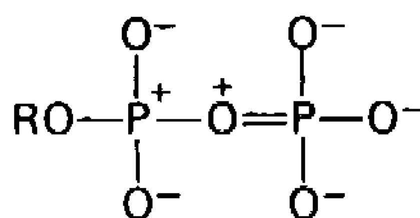


Рис. 11.6. Маловероятная резонансная форма концевой части ATP.

ADP с образованием ATP. Действительно, таков один из путей синтеза ATP при расщеплении сахаров. Важное значение имеет тот факт, что по потенциалу переноса фосфатной группы ATP занимает промежуточное положение в ряду биологически важных фосфорилированных молекул (табл. 11.2). В силу этого промежуточного положения ATP эффективно функционирует в качестве переносчика фосфорильных групп.

ATP часто называют высокоэнергетическим фосфатным соединением и его фосфоангидридные связи относят к высокоэнергетическим связям. Следует отметить, что эти связи сами по себе не обладают какими-либо особыми свойствами. *Они являются высокоэнергетическими связями в том смысле, что при их гидролизе высвобождается* (по причинам, указанным выше) *большое количество свободной энергии.* Введенный Липманом (Lipmann) термин «высокоэнергетическая связь» и предложенный им символ ~P для обозначения соединений с высоким потенциалом переноса фосфатной группы являются выразительными, лаконичными и удобными обозначениями. Концепции Липмана сыграли большую роль в стимулировании интереса к биоэнергетике.

11.7. Гидролиз ATP сдвигает равновесие сопряженных реакций в 10^8 раз

Чтобы лучше понять роль ATP в сопряжении энергии, следует проанализировать химическую реакцию, которая термодинамически невозможна без притока свободной

Таблица 11.2. **Свободная энергия гидролиза некоторых фосфорилированных соединений**

Соединение	$\Delta G^{0\prime}$, ккал/моль
Фосфоенолпируват[1]	−14,8
Карбамоилфосфат	−12,3
Ацетилфосфат	−10,3
Креатинфосфат	−10,3
Пирофосфат	−8,0
ATP (до ADP)	−7,3
Глюкозо-1-фосфат	−5,0
Глюкозо-6-фосфат	−3,3
Глицерол-3-фосфат	−2,2

[1] Обратите внимание, что среди перечисленных соединений фосфоенолпируват имеет самый высокий потенциал переноса фосфатной группы.

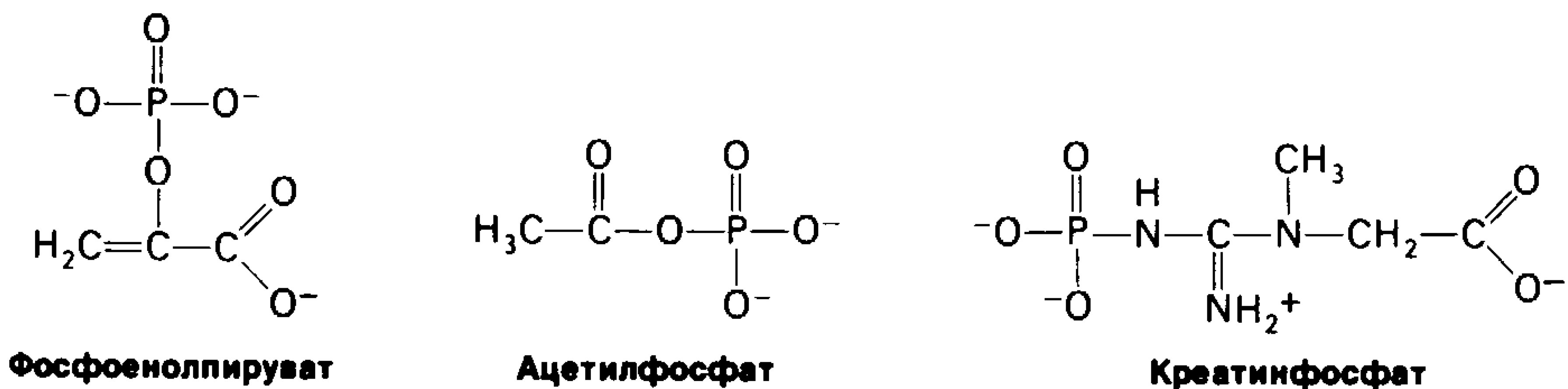
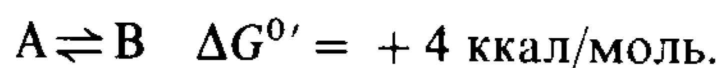


Рис. 11.7. Соединения, имеющие более высокий потенциал переноса фосфатной группы, чем АТР.

энергии. Предположим, что стандартная свободная энергия превращения А в В равна + 4 ккал/моль:

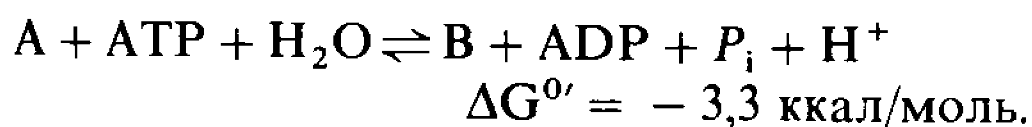


$$A \rightleftharpoons B \quad \Delta G^{0\prime} = +4 \text{ ккал/моль}.$$

В соответствии с уравнением (13) (разд. 11.2) константа равновесия K'_{eq} этой реакции при 25°С выражается отношением

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{0\prime}/1,36} = 1,15 \cdot 10^{-3}.$$

Таким образом, А не может спонтанно превратиться в В, если молярное отношение В к А равно или больше $1,15 \cdot 10^{-3}$. Однако превращение А в В возможно и в том случае, если отношение [В]/[А] превышает $1,15 \cdot 10^{-3}$ при условии, что реакция сопряжена с гидролизом АТР. Суммарное уравнение этой новой реакции будет иметь следующий вид:



$$A + ATP + H_2O \rightleftharpoons B + ADP + P_i + H^+ \quad \Delta G^{0\prime} = -3,3 \text{ ккал/моль}.$$

Указанное изменение стандартной свободной энергии (– 3,3 ккал/моль) представляет собою сумму $\Delta G^{0\prime}$ для превращения А в В (+ 4 ккал/моль) и для гидролиза АТР (– 7,3 ккал/моль). Константа равновесия этой сопряженной реакции выражается отношением:

$$K'_{eq} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} \cdot \frac{[ADP]_{eq}[P_i]_{eq}}{[ATP]_{eq}} = 10^{3,3/1,36} = 2,67 \cdot 10^{-2}.$$

В состоянии равновесия отношение [В] к [А] дается уравнением

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K'_{eq}\frac{[ATP]_{eq}}{[ADP]_{eq}[P_i]_{eq}}.$$

Система генерирования АТР в клетках поддерживает отношение $[ATP]/[ADP]\cdot[P_i]$ на высоком уровне, обычно порядка 500. Для такого отношения

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = 2,67 \cdot 10^2 \cdot 500 = 1,34 \cdot 10^5.$$

Это означает, что гидролиз АТР обеспечивает возможность превращения А в В до тех пор, пока отношение [В]/[А] не достигнет значения $1,34 \cdot 10^5$. Указанное равновесное отношение резко отличается от значения $1,15 \cdot 10^{-3}$ для реакции $A \rightleftharpoons B$ в отсутствие гидролиза АТР. Другими словами, сопряженный гидролиз АТР изменил равновесное отношение В к А примерно в 10^8 раз.

Мы видим, таким образом, что термодинамическая сущность роли АТР – это функционирование в качестве энергосопрягающего агента. *Клетки поддерживают содержание АТР на высоком уровне, используя свет и окисляемые субстраты в качестве источников свободной энергии. Гидролиз одной молекулы АТР резко сдвигает равновесное отношение концентрации продуктов к концентрации реагирующих веществ в сопряженной реакции – примерно в 10^8 раз.* В более общем выражении гидролиз *n* молекул АТР изменяет равновесное отношение сопряженной реакции (или последовательности реакций) в 10^{8n} раз. Например, гидролиз трех молекул АТР в сопряженной реакции изменяет равновесное отношение в 10^{24} раз. Таким образом, *термодинамически невыгодная последовательность реакций может быть превращена в термодинамически выгодную путем сопряжения с гидролизом достаточно большого количества молекул АТР.* Надо также подчеркнуть, что А и В в предыдущем уравнении сопряженной реакции имеют очень общее значение. Например, А и В могут представлять *различные конформации белка* (например, при мышеч-

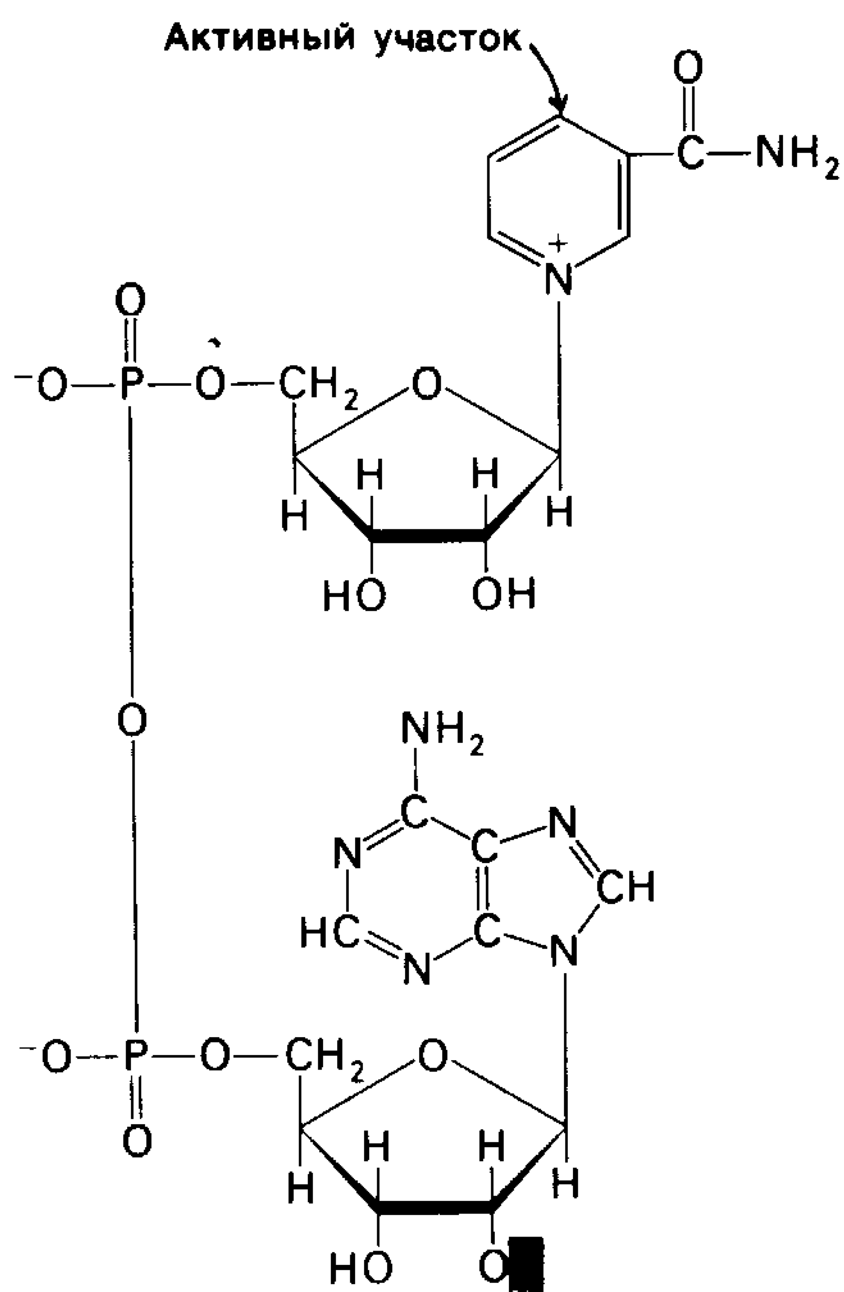


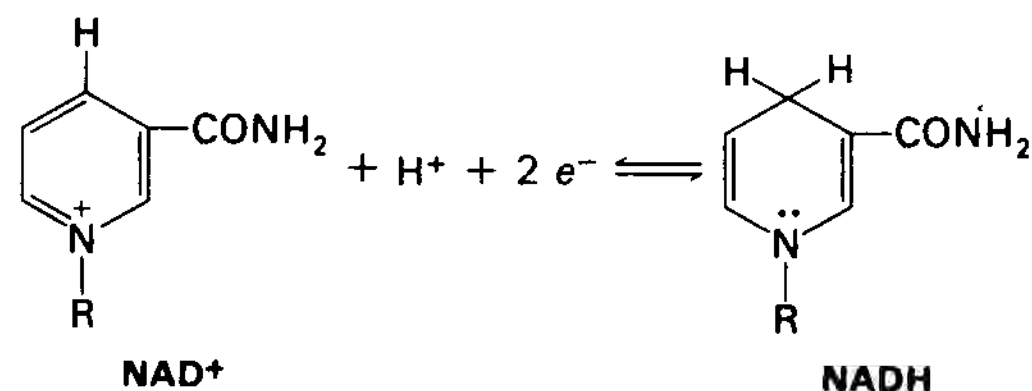
Рис. 11.8. Строение окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NAD^+) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($NADP^+$). В NAD^+ R = = H; в $NADP^+$ R = PO_3^{2-}.

ном сокращении). В других случаях символы А и В могут относиться к *концентрациям ионов или молекул вне и внутри клетки*, как при активном транспорте пищевых веществ. Кроме того, А и В могут обозначать *различные химические категории*, в частности при биосинтезе сложных молекул из простых предшественников. В последующих главах мы рассмотрим многие важные механизмы сопряжения энергии в биологических процессах.

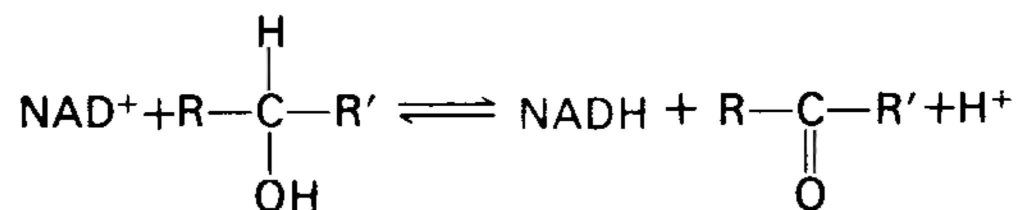
11.8. NADH и $FADH_2$ – основные переносчики электронов при окислении топливных молекул

Хемотрофы получают свободную энергию в результате окисления молекул, выполняющих роль топлива, таких, как глюкоза и жирные кислоты. У аэробных организмов единственным акцептором электронов является O_2. Однако электроны не переносятся прямо на O_2 от топливных молекул и продуктов их распада. Эти соединения переносят электроны к специальным переносчикам – либо *пиридиннуклеотидам*, либо *флавинам*. Восстановленные формы переносчиков доставляют затем свои обладающие высоким энергетическим потенциалом электроны к O_2 по цепи переноса электронов, локализованной во внутренней мембране митохондрий. Перенос электронов по цепи сопровождается образованием АТР из ADP и P_i. Этот процесс, называемый *окислительным фосфорилированием* (гл. 14), служит основным источником АТР у аэробных организмов. Кроме того, электроны с высоким энергетическим потенциалом, возникающие при окислении топливных молекул, могут быть использованы в процессах биосинтеза, для осуществления которых помимо АТР требуются восстановительные *эквиваленты*.

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) – главный акцептор электронов при окислении топливных молекул (рис. 11.8). Реакционноспособная часть NAD^+ – его никотинамидное кольцо. *При окислении субстрата никотинамидное кольцо NAD^+ присоединяет ион водорода и два электрона, которые являются эквивалентами гидрид-иона.* Восстановленная форма этого переносчика – NADH.



NAD^+ – акцептор электронов во многих реакциях типа



В ходе этого дегидрирования один атом водорода субстрата прямо переносится на NAD^+, тогда как второй переходит в растворитель. Оба электрона, теряемые субстратом, переносятся на никотинамидное кольцо.

Второй основной переносчик электронов при окислении топливных молекул – *флавинадениндинуклеотид* (рис. 11.9). Сокращения, используемые для обозначения окисленной и восстановленной форм этого переносчика, – соответственно FAD и

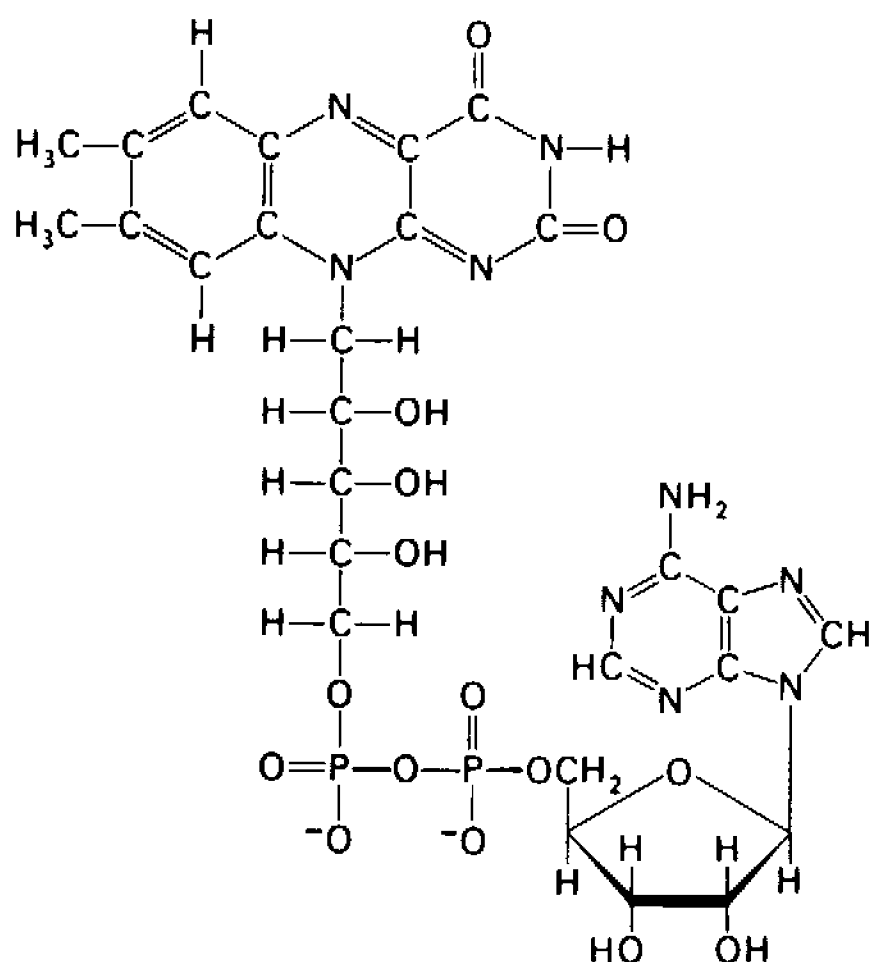
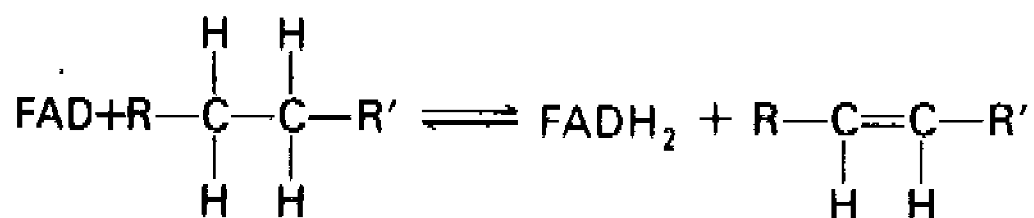


Рис. 11.9. Строение окисленной формы флавинадениндинуклеотида (FAD).

$FADH_2$. FAD является акцептором электронов в реакциях типа

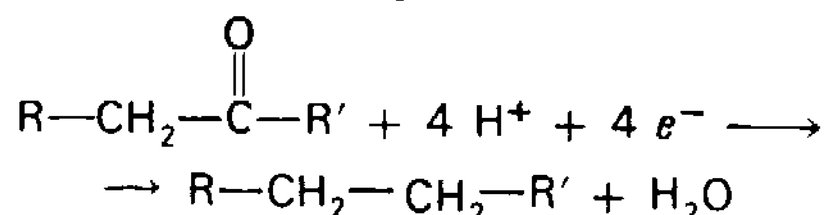


$$FAD + R{-}CH_2{-}CH_2{-}R' \rightleftharpoons FADH_2 + R{-}CH{=}CH{-}R'$$

Реакционноспособная часть FAD – это его изоаллоксазиновое кольцо (рис. 11.10). FAD, подобно NAD^+, присоединяет два электрона. Однако FAD в отличие от NAD^+ присоединяет оба теряемых субстратом атома водорода. Потенциалы переноса групп у NADH и $FADH_2$ и термодинамика окислительно-восстановительных реакций рассматриваются в гл. 14.

11.9. NADPH – главный донор электронов в восстановительном биосинтезе

Соединения, играющие в биосинтетических путях роль предшественников, бывают, как правило, окислены сильнее, чем продукты реакции. Поэтому для осуществления процессов биосинтеза кроме АТР необходимо наличие восстановительного эквивалента. Например, при биосинтезе жирных кислот оксогруппа добавленного C_2-предшественника восстанавливается в несколько стадий в метиленовую группу. Эта последовательность реакций требует присоединения четырех электронов



$$R{-}CH_2{-}CO{-}R' + 4\,H^+ + 4\,e^- \longrightarrow R{-}CH_2{-}CH_2{-}R' + H_2O$$

Роль донора электронов в большинстве процессов восстановительного биосинтеза выполняет восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH; рис. 11.8). NADPH отличается от NADH наличием фосфата, связанного эфирной связью с 2'-гидроксильной группой аденозина. Окисленная форма NADPH обозначается как $NADP^+$. NADPH переносит электроны таким же образом, как NADH.

Однако *NADPH используется почти исключительно в процессах восстановительного биосинтеза, тогда как NADH используется преимущественно для генерирования ATP.* Дополнительная фосфатная группа NADPH – это участок, ответственный за осуществление целевого предназначения молекулы, состоящего в распознавании ферментами. Биологическое значение разграничения функций между NADPH и NADH рассматривается в гл. 15 (стр. 95).

Важно отметить, что NADH, NADPH и $FADH_2$ в отсутствие катализаторов реагируют с O_2 очень медленно. Гидролиз АТР в отсутствие катализатора также идет с низкой скоростью. Данные молекулы кинетически совершенно стабильны, хотя существует большая термодинамическая движущая си-



Окисленная форма (FAD)



Восстановленная форма ($FADH_2$)

Рис. 11.10. Строение реакционноспособных частей FAD^+ и $FADH_2$.

β-Меркаптоэтиламин   Пантотеновая кислота

Кофермент А
(CoA)

Рис. 11.11. Строение кофермента А (CoA).

ла для реакции указанных переносчиков электронов с O_2 и для реакции ATP с водой. *Стабильность этих молекул в отсутствие специфических катализаторов имеет существенное значение для их биологической функции, поскольку она обеспечивает возможность ферментативной регуляции тока свободной энергии и восстановительных эквивалентов.*

11.10. Кофермент А как универсальный переносчик ацильных групп

Кофермент А – другая молекула, занимающая центральное место в метаболизме. В 1945 г. Липман установил, что для многих процессов ацетилирования, катализируемых ферментами, требуется термостабильный кофактор. Этот кофактор был назван *коферментом А* (CoA), где А означает *ацетилирование*. Он был выделен, а несколькими годами позднее была определена его структура (рис. 11.11). Реакционноспособной частью молекулы CoA является концевая сульфгидрильная группа. Ацильные группы присоединяются к CoA при помощи тиоэфирной

$$R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-S-CoA$$

Ацил-CoA

$$H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-S-CoA$$

Ацетил-CoA

связи. Образующееся в результате этого производное получило название *ацил-CoA*. Ацильная группа, связанная с CoA, часто бывает представлена ацетильной группой. Это производное называют *ацетил-CoA*. $\Delta G^{0\prime}$ для гидролиза ацетил-CoA имеет большую отрицательную величину:

$$\text{Ацетил-CoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{Ацетат} + \text{CoA} + H^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -7{,}5\ \text{ккал/моль}.$$

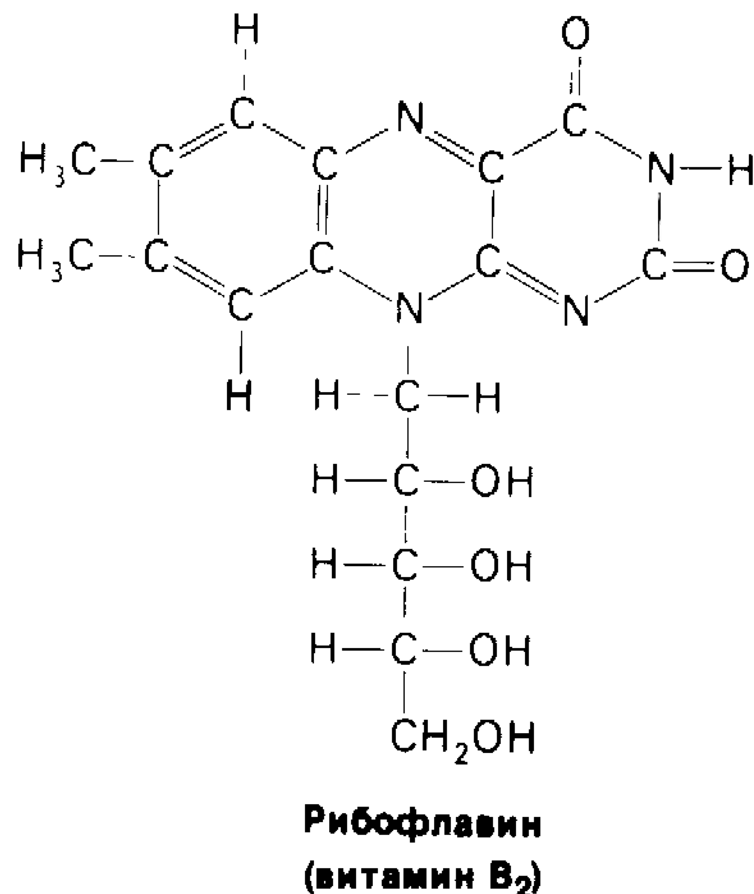
Другими словами, *ацетил-CoA имеет высокий потенциал переноса ацетильных групп.* CoA является переносчиком активированных ацетильных или других ацильных групп, подобно тому как ATP служит переносчиком активированных фосфорильных групп.

Таблица 11.3. **Некоторые активированные переносчики в метаболизме**

Молекула-переносчик	Что переносится в активированной форме
ATP	Фосфорильная группа
NADH и NADPH	Электроны
$FADH_2$	"
Кофермент А	Ацильная группа
Липоамид	" "
Тиаминпирофосфат	Альдегид
Биотин	CO_2
Тетрагидрофолят	Одноуглеродный фрагмент
S-аденозилметионин	Метильная группа
Уридиндифосфатглюкоза	Глюкоза
Цитидиндифосфатдиацилглицерол	Фосфатидат



Пантотенат



Рибофлавин (витамин B_2)



Никотинат (ниацин)



Пиридоксин (форма витамина B_6)

Рис. 11.12. Строение некоторых водорастворимых витаминов.

При дальнейшем рассмотрении процессов метаболизма мы встретимся и с другими переносчиками активированных групп. Некоторые из них перечислены в табл. 11.3. Эти переносчики опосредуют обмен активированных групп в многочисленных биохимических реакциях. Они действительно играют очень сходную роль во всех формах жизни. Их универсальное присутствие – один из интегральных моментов биохимии.

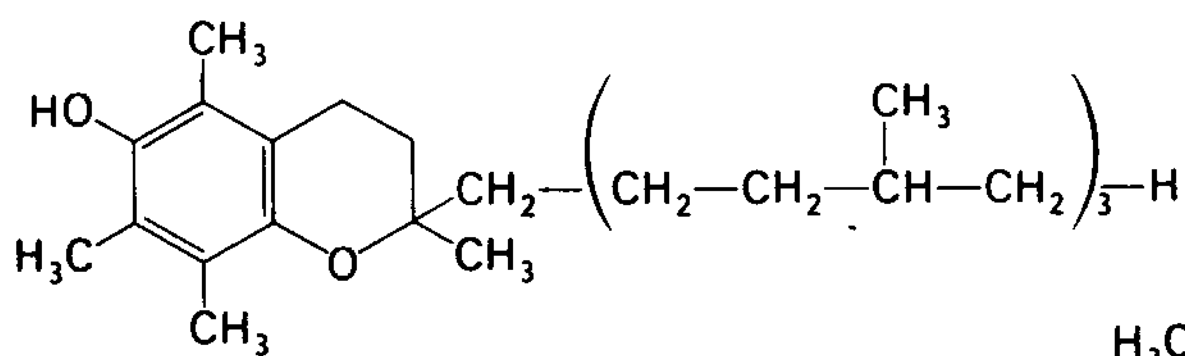
11.11. Большинство водорастворимых витаминов являются компонентами коферментов

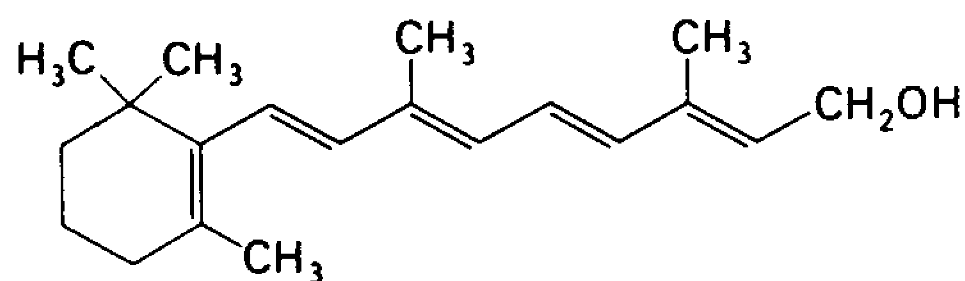
Липман писал: «Врачи любят прописывать витамины, и миллионы людей принимают их, однако потребовалась немалая биохимическая изобретательность, чтобы понять, почему они необходимы и каким образом организм их использует». Витамины – органические молекулы, которые в малых количествах должны присутствовать в рационе высших животных. Эти молекулы играют почти одинаковую роль во всех формах жизни, однако высшие животные утратили способность их синтезировать. Существуют две группы витаминов: жирорастворимые, обозначаемые буквами A, D, E и K, и водорастворимые, к которым относятся витамины группы B. Биохимическая роль водорастворимых витаминов в основном известна. Большинство из них представляют собой компоненты коферментов (табл. 11.4). Например, рибофлавин (витамин B_2) – предшественник FAD, а пантотенат является компонентом кофермента A.

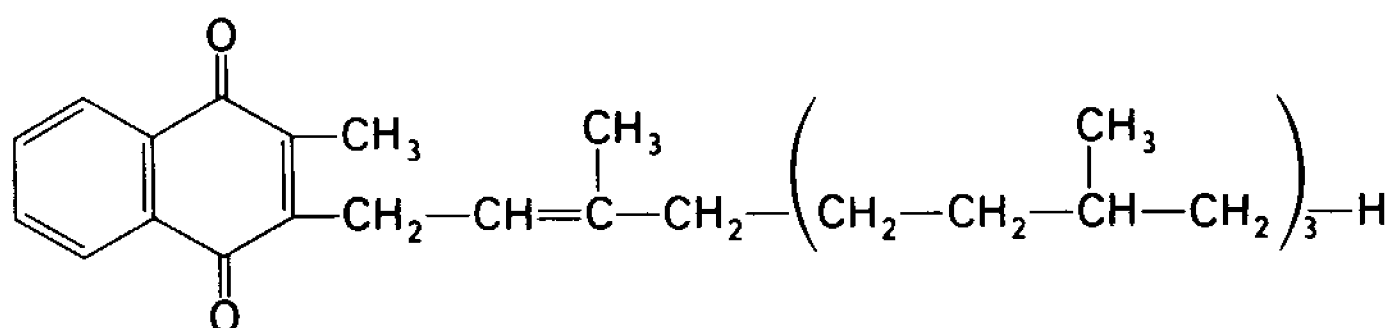
Молекулярная основа действия жирорастворимых витаминов (рис. 11.13) изучена значительно хуже. Витамин K, необходимый для нормального свертывания крови, участвует в карбоксилировании остатков глутамата в γ-карбоксиглутамат (разд. 8.23). Витамин A (ретинол) предшественник ретиналя, светопоглощающей группы в составе зрительных пигментов (разд. 37.13). Недостаток этого витамина приводит к куриной слепоте. Кроме того, молодым животным витамин A требуется

Таблица 11.4. **Коферментные производные некоторых водорастворимых витаминов**

Витамин	Коферментное производное
Тиамин (витамин B_1)	Тиаминпирофосфат
Рибофлавин (витамин B_2)	Флавинадениндинуклеотид и флавинмононуклеотид
Никотиновая кислота (ниацин)	Никотинамидадениндинуклеотид
Пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин (витамин B_6)	Пиридоксальфосфат
Пантотеновая кислота	Кофермент A
Биотин	Ковалентно связан с карбоксилазами
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолят
Кобаламин (витамин B_{12})	Кобамидные коферменты







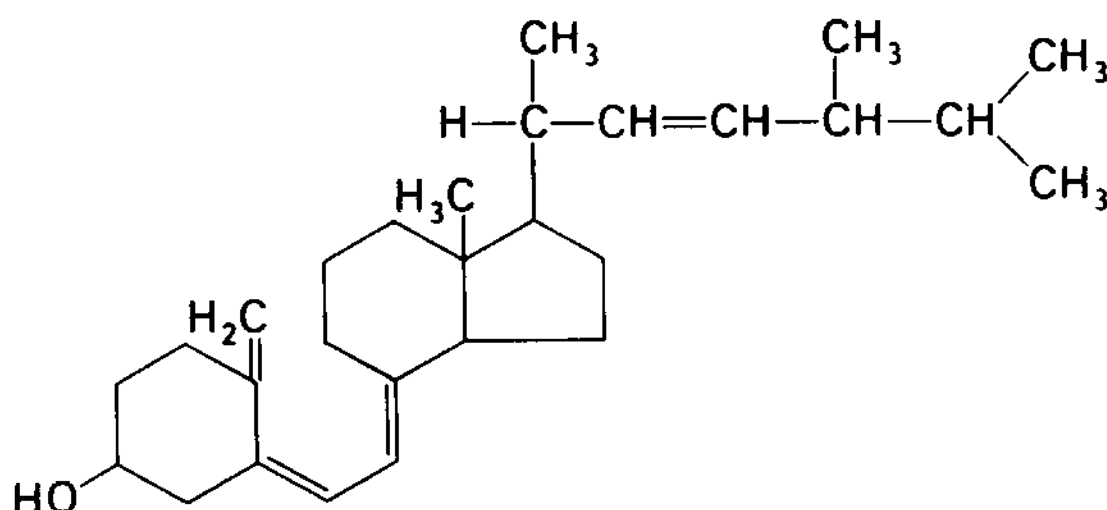


Рис. 11.13. Строение некоторых жирорастворимых витаминов.

для роста. Метаболизм кальция и фосфора регулируется гормоном-производным витамина D (разд. 20.26). При недостатке витамина D нарушается формирование костной ткани у растущих животных. Недостаточность витамина E у крыс приводит к бесплодию. Этот витамин защищает ненасыщенные мембранные липиды от окисления.

11.12. Стадии извлечения энергии из пищевых веществ

Рассмотрим в общих чертах процесс генерирования энергии у высших организмов, прежде чем перейти в последующих главах к детальному анализу этих реакций. Ганс Кребс (Hans Krebs) описал три стадии генерирования энергии при окислении питательных веществ. *На первой стадии крупные молекулы пищи расщепляются на более мелкие компоненты.* Белки гидролизуются на 20 типов аминокислот; полисахариды гидролизуются до простых сахаров, таких, как глюкоза; жиры распадаются на глицерол и жирные кислоты (рис. 11.14). На этой стадии не происходит высвобождения биологически полезной энергии. *На второй стадии многочисленные малые молекулы, образовавшиеся в результате первой стадии, распадаются до нескольких простых компонентов, играющих центральную роль в метаболизме.* Большинство из них-сахара, жирные кислоты, глицерол и некоторые аминокислоты-превращаются в ацетильную часть ацетил-CoA. На этой стадии происходит образование ATP, но в значительно меньшем количестве, чем при полном окислении ацетильного компонента ацетил-CoA. *Третья стадия-это цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование*, представляющие собой конечные общие пути в окислении топливных молекул. Ацетил-CoA привносит свои ацетильные компоненты в этот цикл, где они полностью окисляются до CO_2. При окислении каждой ацетильной группы имеет место перенос на NAD^+ и FAD четырех пар электронов. В процессе переноса

электронов от восстановленных форм этих переносчиков к O_2 происходит генерирование ATP – процесс, названный окислительным фосфорилированием. Бóльшая часть ATP, генерируемого при расщеплении пищевых веществ, образуется на этой третьей стадии.

11.13. Процессы обмена веществ регулируются множеством различных механизмов

Даже в простейшей бактериальной клетке может протекать более тысячи взаимозависимых реакций. Очевидно, что эта сложная система должна строго регулироваться. Более того, регуляция обмена веществ должна быть гибкой в силу непостоянства условий внешней среды. Исследование широкого круга организмов показало, что существует много различных механизмов регуляции метаболизма. Следует подчеркнуть, что хотя центральные метаболические пути в настоящее время почти полностью установлены, изучение механизмов их регуляции до сих пор находится в зачаточном состоянии. Немногие вопросы современной биохимии представляют собой настолько важную и захватывающую проблему.

Главный механизм регуляции метаболизма – контроль *количества* некоторых ферментов. Этот механизм широко исследовался у бактерий. Регуляция *скорости синтеза* β-галактозидазы и других белков, необходимых для использования лактозы, представляет собой классический пример, который детально рассматривается в гл. 28. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что регуляции подвержена также *скорость расщепления* некоторых ферментов. Регуляция метаболизма достигается и путем контроля *каталитической активности* определенных ферментов. Общий и важный механизм регуляции – *обратимый аллостерический контроль*. Например, во многих биосинтетических процессах имеет место аллостерическое ингибирование первой реакции конечным продуктом процесса; это взаимодействие называют *ингибированием по принципу обратной связи*, или *ретроингибированием*. Активность некоторых ферментов модулируется также путем *ковалентных модификаций*, таких, как фосфорилирование специфического серинового остатка.

Важный общий принцип метаболизма состоит в следующем: *пути биосинтеза и рас-*

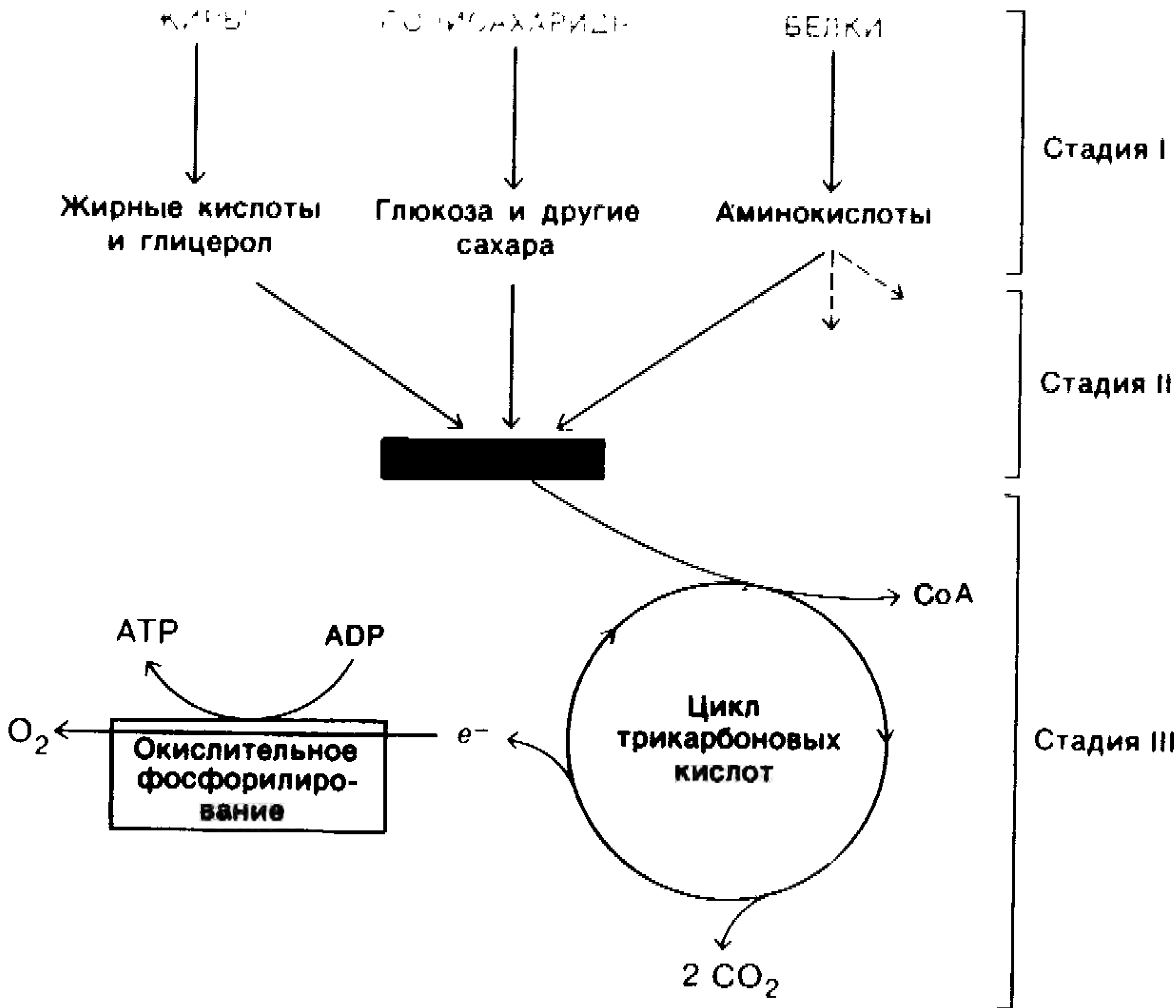


Рис. 11.14. Стадии извлечения энергии из пищевых веществ.

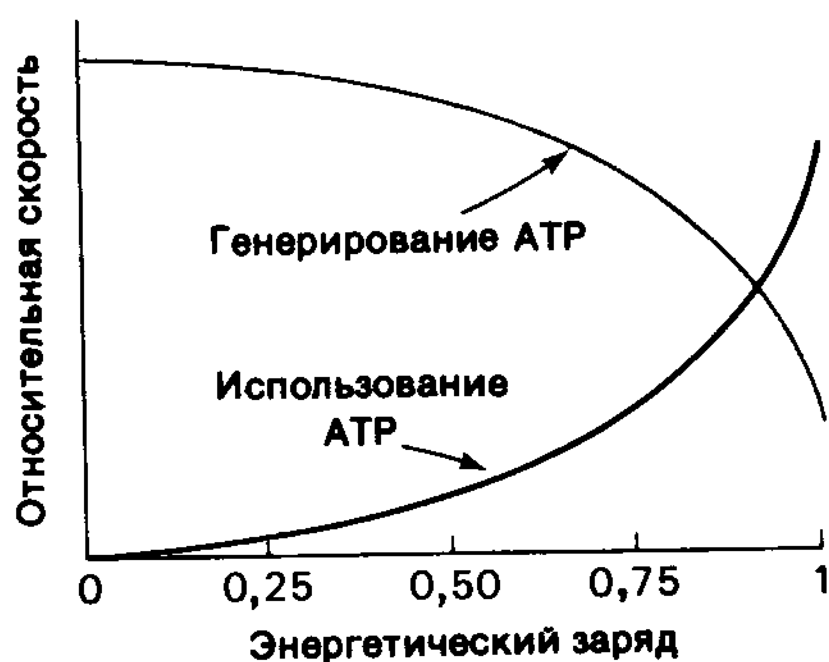


Рис. 11.15. Влияние энергетического заряда на относительную скорость типичного генерирующего ATP (катаболического) пути и типичного использующего ATP (анаболического) пути.

пада почти всегда разобщены. Это разобщение, как будет показано в последующих главах, необходимо по энергетическим причинам. Оно также способствует регуляции метаболизма. У эукариот возможности метаболической регуляции и ее гибкость усиливаются благодаря наличию *компартментации.* Например, окисление жирных кислот протекает в митохондриях, а их синтез – в цитозоле (растворимой части цитоплазмы). Компартментация пространственно разобщает эти противоположно направленные реакции.

Многие метаболические реакции отчасти регулируются *энергетическим статусом* клетки. Показателем энергетического статуса служит *энергетический заряд*, который пропорционален сумме молярной фракции ATP и половины молярной фракции ADP (учитывая, что ATP содержит две, а ADP – одну ангидридную связь). Отсюда энергетический заряд вычисляется по формуле

Энергетический заряд =

$$= \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}.$$

Значение энергетического заряда может колебаться от 0 (в системе присутствует только AMP) до 1 (в системе присутствует только ATP). Дэниел Аткинсон (Daniel Atkinson) показал, что *метаболические пути, ведущие к синтезу ATP, ингибируются высоким энергетическим зарядом, тогда как пути использования ATP стимулируются высоким энергетическим зарядом.* При графическом изображении зависимости между скоростью этих процессов (генерирования и использования ATP) и энергетическим зарядом кривые идут наиболее круто вблизи значения энергетического заряда 0,9, при котором они обычно пересекаются (рис. 11.15). Очевидно, что регуляция этих путей метаболизма направлена на поддержание энергетического заряда в сравнительно узких пределах. Другими словами, *энергетический заряд, так же как pH клетки, забуферен.* Его значение в большинстве клеток находится в диапазоне 0,80–0,95. Другой показатель энергетического статуса – это *потенциал фосфорилирования*, который определяется уравнением

Потенциал фосфорилирования =

$$= \frac{[ATP]}{[ADP]\,[P_i]}.$$

Потенциал фосфорилирования в противоположность энергетическому заряду зависит от концентрации P_i и прямо связан со свободной энергией, высвобождаемой при расщеплении ATP.

Заключение

Клетки извлекают энергию из окружающей среды и превращают питательные вещества в клеточные компоненты при помощи высокоинтегрированной системы химических реакций, называемой обменом веществ, или метаболизмом. Наиболее ценная для понимания энергетики метаболизма термодинамическая концепция – это концепция свободной энергии, являющейся критерием способности системы выполнять полезную работу при постоянном давлении и постоянной температуре. Реакция может протекать спонтанно только при отрицательном значении изменения свободной энергии (ΔG). ΔG не зависит от пути, по которому идет реакция, и зависит только от природы реагирующих веществ и их активности (которую можно иногда примерно определять по их концентрации). Изменение свободной энергии реакции в условиях, когда активность реагирующих веществ и образующихся про-

дуктов равна единице, называется изменением стандартной свободной энергии (ΔG^0). Биохимики обычно используют символ $\Delta G^{0\prime}$, обозначающий изменение стандартной свободной энергии при pH 7. ATP, универсальная энергетическая валюта в биологических системах, представляет собою богатую энергией молекулу, что обусловлено наличием в ней двух ангидридных связей. Электростатическое отталкивание между этими отрицательно заряженными группами уменьшается при гидролизе ATP. ADP и P_i стабилизируются под действием резонанса в большей степени, чем ATP. Гидролиз ATP сдвигает равновесие сопряженной реакции примерно в 10^8 раз.

Основная стратегия метаболизма состоит в образовании ATP, NADPH и предшественников макромолекул. ATP потребляется при мышечном сокращении и других видах двигательной активности клеток, в активном транспорте и в различных процессах биосинтеза. NADPH, являющийся носителем двух электронов с высоким потенциалом, обеспечивает восстановительные эквиваленты для биосинтеза клеточных компонентов из более окисленных предшественников. ATP и NADPH непрерывно образуются и потребляются. Извлечение энергии из питательных веществ у аэробных организмов происходит в три стадии. На первой стадии крупные молекулы распадаются на более мелкие, такие, как аминокислоты, сахара и жирные кислоты. На второй стадии эти небольшие молекулы расщепляются до нескольких простых компонентов, играющих повсеместную роль в метаболизме. Одним из таких компонентов является ацетильная часть ацетил-CoA, носителя активированных ацильных групп. Третья стадия метаболизма представлена циклом трикарбоновых кислот и окислительным фосфорилированием, в ходе которых молекулы, играющие роль топлива, полностью окисляются до CO_2, что сопровождается образованием ATP при переносе электронов на O_2, конечный их акцептор.

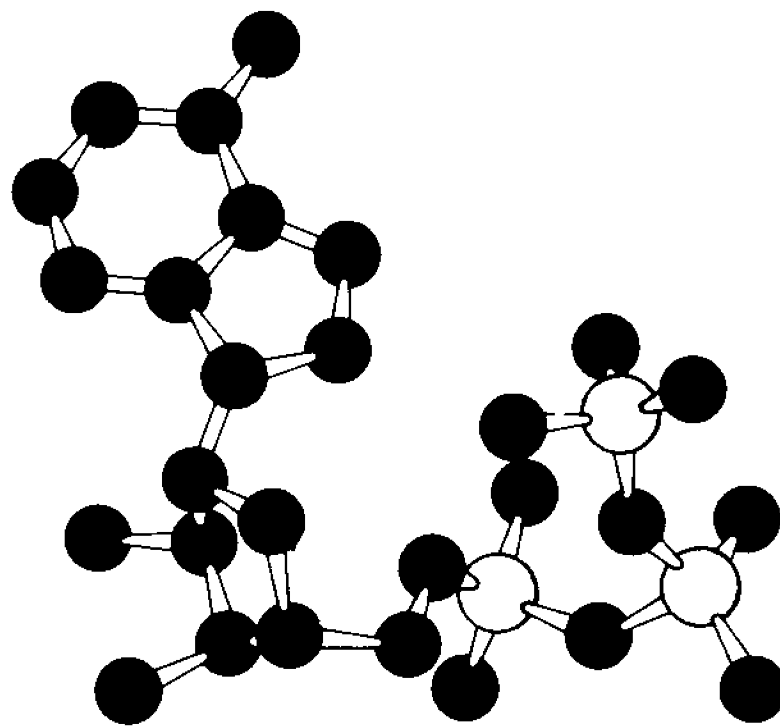


Рис. 11.16. Модель аденозинтрифосфата (ATP).

Регуляция метаболизма осуществляется различными путями. Количество некоторых лимитирующих ферментов контролируется скоростью синтеза и распада белка. Кроме того, каталитическая активность ряда ферментов регулируется аллостерическими взаимодействиями (как при ингибировании по принципу обратной связи) и ковалентными модификациями. Компартментация и разобщение путей биосинтеза и расщепления также вносят определенный вклад в регуляцию обмена веществ. Энергетический заряд, зависящий от относительных количеств ATP, ADP и AMP, также участвует в механизмах регуляции. Высокий энергетический заряд ингибирует процессы, связанные с генерированием ATP (катаболические пути), но стимулирует использование ATP (анаболические пути).

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Обзоры по метаболизму

Krebs H. A., Kornberg H. L., 1957. Energy Transformations in Living Matter, Springer-Verlag. (Включает ценное приложение К. Бартона, содержащее термодинамические данные.)

Wood W. B., 1974. The Molecular Basis of Metabolism, Unit 3 in Biocore, McGraw-Hill.

Термодинамика

Klotz I. M., 1967. Energy Changes in Biochemical Reactions, Academic Press. (Краткое, глубоко содержательное руководство.) [Имеется перевод: Клотц И. Энергетика биохимических реакций.- М.: Мир, 1970.]

Bray H. G., White K., 1966. Kinetics and Thermodynamics in Biochemisctry (2nd ed.), Academic Press.

Hill T. L., 1977. Free Energy Transduction in Biology, Academic Press.

Ingraham L. L., Pardee A. B., 1967. Free energy and entropy in metabolism. In: Greenberg D. M. (ed.), Metabolic Pathways (3rd ed.), vol. 1, pp. 1–46, Academic Press.

Alberty R. A., 1968. Effect of pH and metal ion concentration on the

equilibrium hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, J. Biol. Chem., **243**, 1337–1343.

Jencks W.P., 1970. Free energies of hydrolysis and decarboxylation. In: Sober H.A. (ed.), Handbook of Biochemistry (2nd ed.), pp. J181–J186, Chemical Rubber Co.

Регуляция метаболизма

Newsholme E.A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism, Wiley. (Великолепный анализ регуляции метаболизма у млекопитающих.) [Имеется перевод: Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма.– М.: Мир, 1977.]

Atkinson D.E., 1977. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation, Academic Press. (Содержит детальный анализ понятия энергетического заряда и других аспектов регуляции метаболизма.)

Erecińska M., Wilson D.F., 1978. Homeostatic regulation of cellular energy metabolism. Trends Biochem. Sci., **3**, 219–223. (Обзор по регуляторной роли потенциала фосфорилирования в митохондриях.)

Исторические аспекты

Kalckar H.M. (ed.), 1969. Biological Phosphorylations, Prentice-Hall. (Ценное собрание многих классических работ по биоэнергетике.)

Fruton J.S., 1972. Molecules and Life, Wiley-Interscience. (Доступный научный анализ взаимосвязи между химией и биологией начиная с 1800 г. В числе тем, рассматриваемых детально,– метаболизм и биоэнергетика.)

Lipmann F., 1971. Wanderings of a Biochemist, Wiley-Interscience. (Содержит перепечатки некоторых классических статей автора и ряд великолепных очерков.)

Вопросы и задачи

1. Каково направление каждой из следующих реакций, если реагирующие вещества первоначально присутствуют в эквимолярных количествах? Используйте значения, приведенные в табл. 11.2.

а) ATP + Креатин ⇌ Креатинфосфат + + ADP.

б) ATP + Глицерол ⇌ ⇌ Глицерол-3-фосфат + ADP.

в) ATP + Пируват ⇌ ⇌ Фосфоенолпируват + ADP.

г) ATP + Глюкоза ⇌ ⇌ Глюкозо-6-фосфат + ADP.

2. Как можно использовать значения $\Delta G^{0\prime}$, приведенные в табл. 11.2, для определения относительной скорости гидролиза пирофосфата и ацетилфосфата?

3. Обдумайте реакцию


ATP + Пируват ⇌

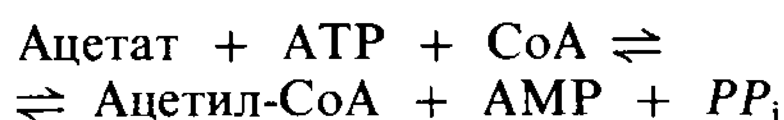

⇌ Фосфоенолпируват + ADP

а) Вычислите $\Delta G^{0\prime}$ и K'_{eq} при 25°C для этой реакции, используя данные из табл. 11.2.

б) Каково равновесное отношение [пируват]/[фосфоенолпируват], если отношение [ATP]/[ADP] равно 10?

4. Вычислите $\Delta G^{0\prime}$ для изомеризации глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат. Каково равновесное отношение [глюкозо-6-фосфат]/[глюкозо-1-фосфат] при 25°C?

5. Образование ацетил-CoA из ацетата – реакция, активируемая ATP:


Ацетат + ATP + CoA ⇌
⇌ Ацетил-CoA + AMP + PP_i

а) Вычислите $\Delta G^{0\prime}$ для этой реакции, используя данные, содержащиеся в настоящей главе.

б) PP_i, образующийся в приведенной выше реакции, быстро гидролизуется in vivo вследствие повсеместного присутствия неорганической пирофосфатазы. $\Delta G^{0\prime}$ для гидролиза PP_i равно − 8 ккал/моль. Вычислите $\Delta G^{0\prime}$ для суммарной реакции. Какое действие оказывает гидролиз PP_i на образование ацетил-CoA?

6. p*K* кислоты служит мерой потенциала переноса ее протонной группы.

а) Выведите соотношение между ΔG^0 и p*K*.

б) Каково значение ΔG^0 для ионизации уксусной кислоты, p*K* которой составляет 4,8?

7. Каковы общие особенности структуры ATP, FAD, NAD^+ и CoA?

8. Фибриноген содержит тирозин-O-сульфат. Предложите активированную форму сульфата, которая может реагировать in vivo с ароматической гидроксильной группой остатка тирозина в белке с образованием тирозин-O-сульфата.

Дополнительные вопросы см.: Wood W.B., Wilson J.H., Benbow, Hood L.E., Biochemistry: A Problems Approach (Benjamin, 1974), ch. 8; Klotz I.M., Energy Changes in Biochemical Reactions (Academic Press, 1967); Montgomery R., Swenson C.A., Quantitative Problems in the Biochemical Sciences, 2nd ed. (Freeman, 1976), ch. 10.

ГЛАВА 12
Гликолиз

Мы начнем рассматривать генерирование метаболической энергии с гликолиза, почти универсального процесса для биологических систем. *Гликолиз – это последовательность реакций, приводящих к превращению глюкозы в пируват с одновременным образованием ATP.* У аэробных организмов гликолиз предшествует циклу трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов, которые вместе извлекают большую часть энергии, содержащейся в глюкозе. При аэробных условиях пируват проникает в митохондрии, где он полностью окисляется до CO_2 и H_2O. При недостаточном содержании кислорода, как это может иметь место в активно сокращающейся мышце, пируват превращается в лактат. У некоторых анаэробных организмов, таких, как дрожжи, пируват превращается не в лактат, а в этанол. Образование этанола и лактата из глюкозы – это примеры брожения.

Изучение гликолиза имеет богатую историю. Исследование этого центрального метаболического пути шло рука об руку с развитием биохимии. Основное открытие сделали совершенно случайно Ганс и Эдуард Бухнеры (Hans Buchner, Eduard Buchner) в 1897 г. Они работали над получением бесклеточных экстрактов дрожжей с целью их возможного терапевтического применения. Эти экстракты надо было хранить без добавления антисептиков, таких, как фенол, и они решили испробовать сахарозу, которая обычно используется для предохранения продуктов в пищевой химии. Результат оказался поразительным: под действием дрожжевого сока сахароза быстро сбраживалась, образуя спирт. Это открытие имело огромное значение. *Бухнеры впервые показали, что брожение может происходить вне живых клеток.* В то время было принято считать, согласно утверждению Луи Пастера, высказанному в 1860 г., что брожение неразрывно связано с живыми клетками. Случайное открытие Бухнеров опровергло эту виталистическую догму и открыло дорогу новой биохимии. Метаболизм стал химией.

Следующий важный вклад в изучение этой проблемы сделали Артур Гарден и Уильям Ионг (Arthur Harden, William Young) в 1905 г. Они добавляли дрожжевой сок к раствору глюкозы и обнаружили, что брожение начиналось при этом почти немедленно. Однако, если они не добавляли неорганический фосфат, то скорость брожения вскоре значительно снижалась. Более того, они установили, что добавленный неорганический фосфат в ходе брожения исчезал, и сделали из этого вывод о том, что он включается в фосфосахар. Гарден и Ионг выделили гексозобисфосфат, который при дальнейшем анализе оказался фруктозо-1,6-бисфосфатом. Они открыли также присут-

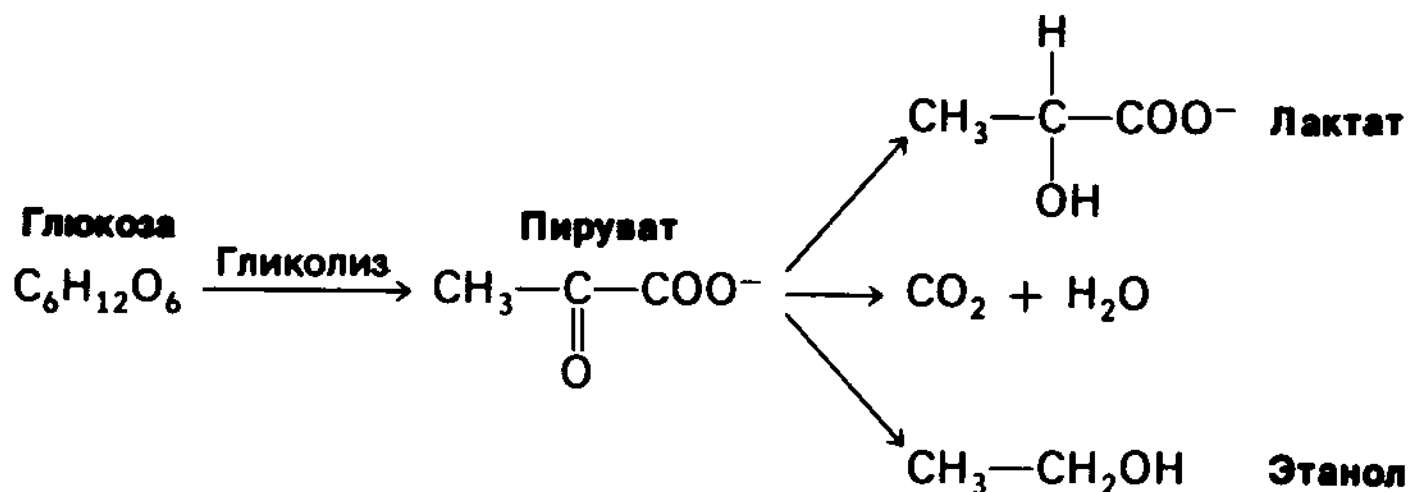


Рис. 12.1. Некоторые превращения глюкозы.

Гликолиз –

происходит от греческих слов glycos – сахар (сладкий) и lysis – растворение.

Брожение –

процесс генерирования ATP, в котором органические соединения действуют и как доноры, и как акцепторы электронов. Может протекать в отсутствие O_2. Открыто Пастером, который описал брожение как la vie sans l'air (жизнь без воздуха).

Энзим –

термин, предложенный Фридрихом Вильгельмом Кюне (Fridrich Wilhelm Kühne) в 1878 г. для обозначения каталитически активных соединений, которые ранее назывались ферментами. Происходит от греческих слов en – в и zyme – дрожжи.

ствие в дрожжевом соке двух видов веществ, необходимых для брожения: зимазы и козимазы. Оказалось, что при диализе или нагревании до 50°С дрожжевой сок теряет свою активность. Однако неактивный диализированный сок активируется после смешивания с неактивным прогретым соком. Таким образом, активность зависит от присутствия в растворе двух типов веществ: термолабильного недиализуемого компонента (названного *зимазой*) и термостабильной диализуемой фракции (названной *козимазой*). Теперь мы знаем, что на самом деле зимаза представляет собой совокупность нескольких ферментов (энзимов), а козимаза состоит из ионов металлов, аденозинтрифосфата (ATP), аденозиндифосфата (ADP) и коферментов (коэнзимов), таких, как никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+).

Исследования мышечных экстрактов, проведенные несколькими годами позднее, показали, что многие реакции молочнокислого брожения подобны реакциям спиртового брожения. *Это было волнующее открытие, потому что оно вскрывало существование внутреннего единства в биохимии.* Полностью гликолитический путь был установлен к 1940 г. главным образом благодаря работам Густава Эмбдена, Отто Мейергофа, Карла Нойберга, Якоба Парнаса, Отто Варбурга, Герти Кори и Карла Кори (Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl Neuberg, Jacob Parnas, Otto Warburg, Gerti Cori, Carl Cori). Гликолиз иногда называют путем Эмбдена–Мейергофа.

12.1. Номенклатура и конформация моносахаридов

Прежде чем обратиться к реакциям гликолиза, рассмотрим номенклатуру и структуру простейших углеводов – моносахаридов. Моносахариды представляют собою альдегиды или кетоны, содержащие две или более гидроксильные группы; их эмпирическая формула $(CH_2O)_n$. Простейшие из них, для которых $n = 3$, – это глицеральдегид и дигидроксиацетон. Они являются *триозами*. Глицеральдегид назван *альдозой*, потому что он содержит альдегидную группу, тогда

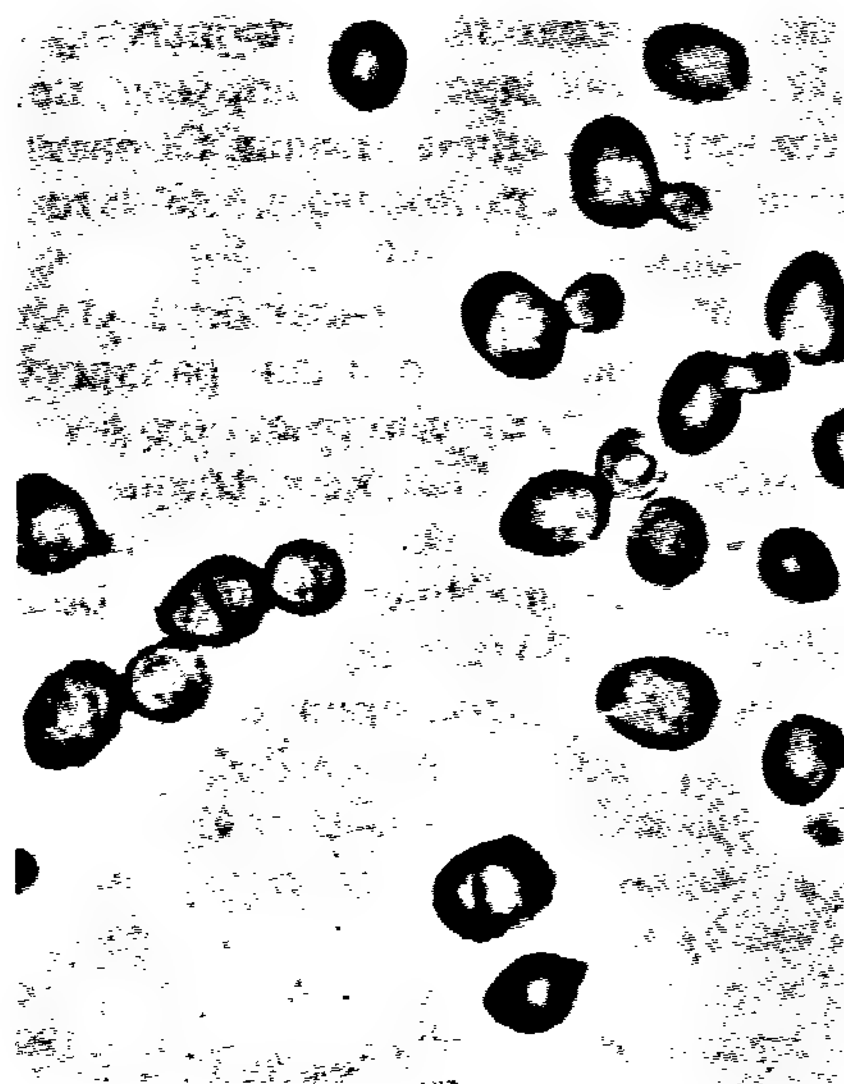
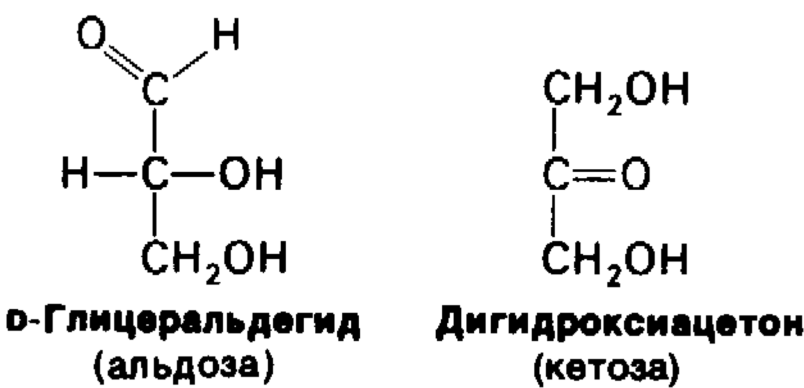
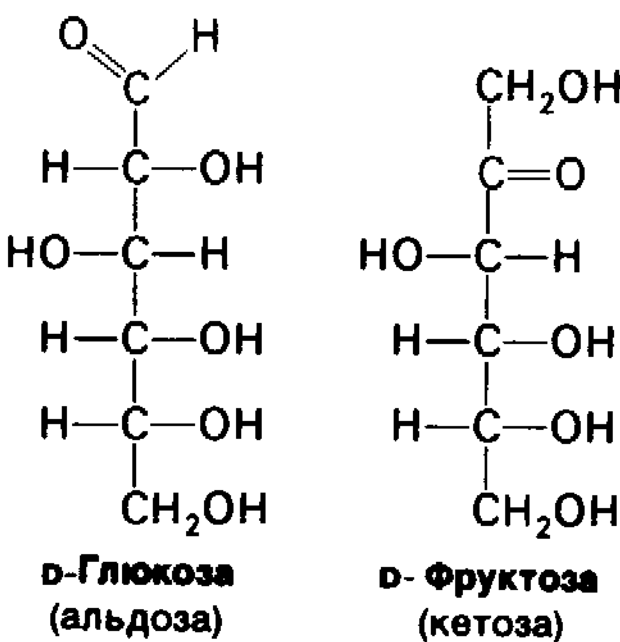


Рис. 12.2. Микрофотография дрожжевых клеток, полученная с помощью светового микроскопа. (Печатается с любезного разрешения д-ра Randy Schekman.)

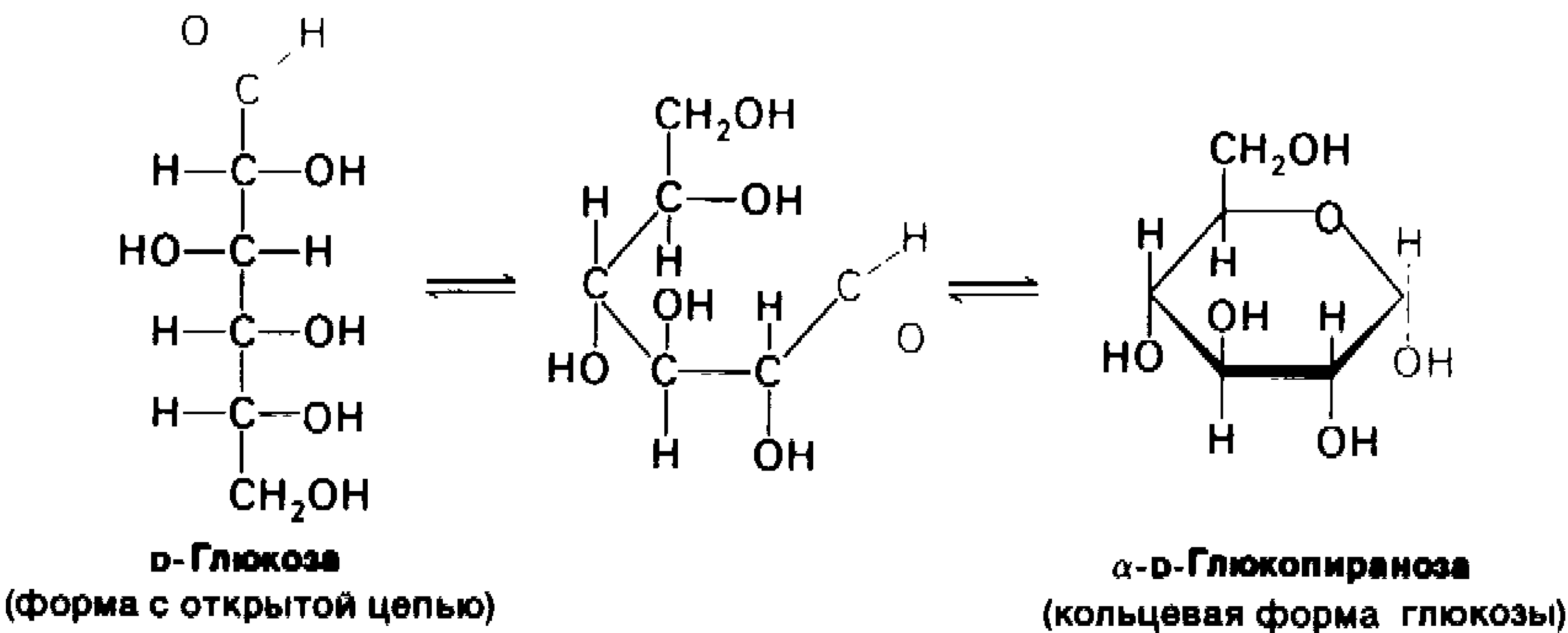
как дигидроксиацетон – *кетоза*, поскольку он содержит кетогруппу.



Глицеральдегид имеет один асимметрический атом углерода. А это означает, что существуют два стереоизомера этой трехуглеродной альдозы, называемые D-глицеральдегид и L-глицеральдегид. Приставки



В растворе глюкоза и фруктоза редко находятся в виде структуры с открытой цепью. Глюкоза и фруктоза с открытой цепью могут циклизоваться в кольцо.



D- и L- обозначают абсолютную конфигурацию.

Сахара с 4, 5, 6 и 7 углеродными атомами называются соответственно *тетрозами*, *пентозами*, *гексозами* и *гептозами*. Их формулы и стереохимические соотношения приведены в приложении к этой главе (стр. 46). Две широко распространенные гексозы – это D-*глюкоза* и D-фруктоза. Символ D означает, что абсолютная конфигурация при асимметрическом атоме углерода, наиболее отдаленном от альдегидной группы или кетогруппы, а именно при С-5 подобна таковой в D-глицеральдегиде. Заметим, что глюкоза является альдозой, а фруктоза – кетозой.

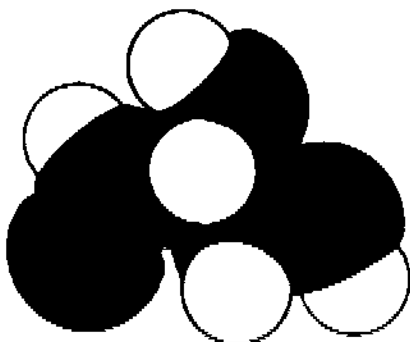
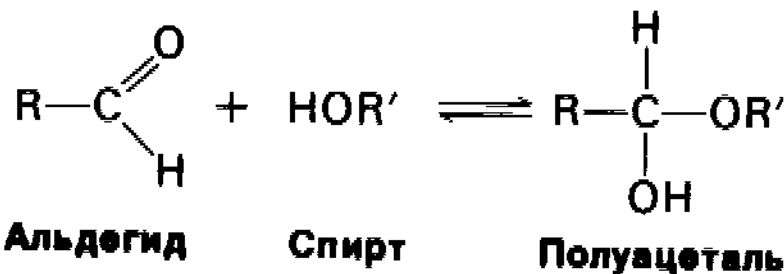


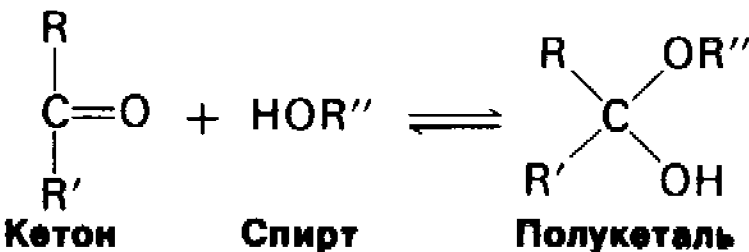
Рис. 12.3. Абсолютная конфигурация D-глицеральдегида.

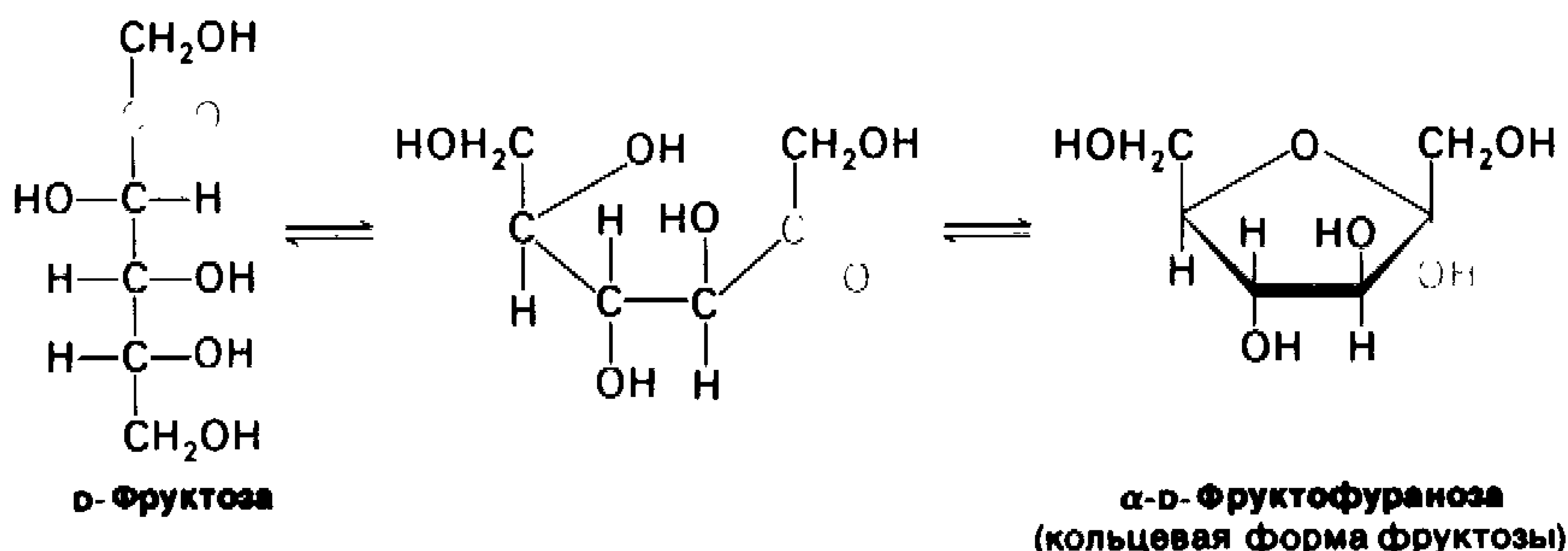
В общем выражении альдегид может реагировать со спиртом с образованием *полуацеталя*. Альдегидная группа при С-1 в молекуле глюкозы с открытой цепью реагирует с гидроксильной группой при С-5, образуя *внутримолекулярный полуацеталь*.



Возникший в результате шестичленный кольцевой сахар назван *пиранозой* из-за его сходства с пираном.

Подобно этому, кетон может реагировать со спиртом, давая *полукеталь*.

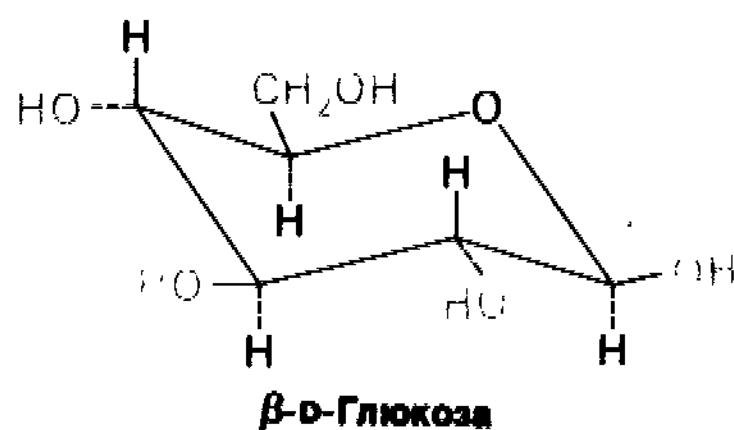




Кетогруппа при С-2 фруктозы с открытой цепью взаимодействует с гидроксильной группой при С-5 с образованием *внутримолекулярного полукеталя*. Этот пятичленный кольцевой сахар назван *фуранозой* из-за его сходства с фураном.



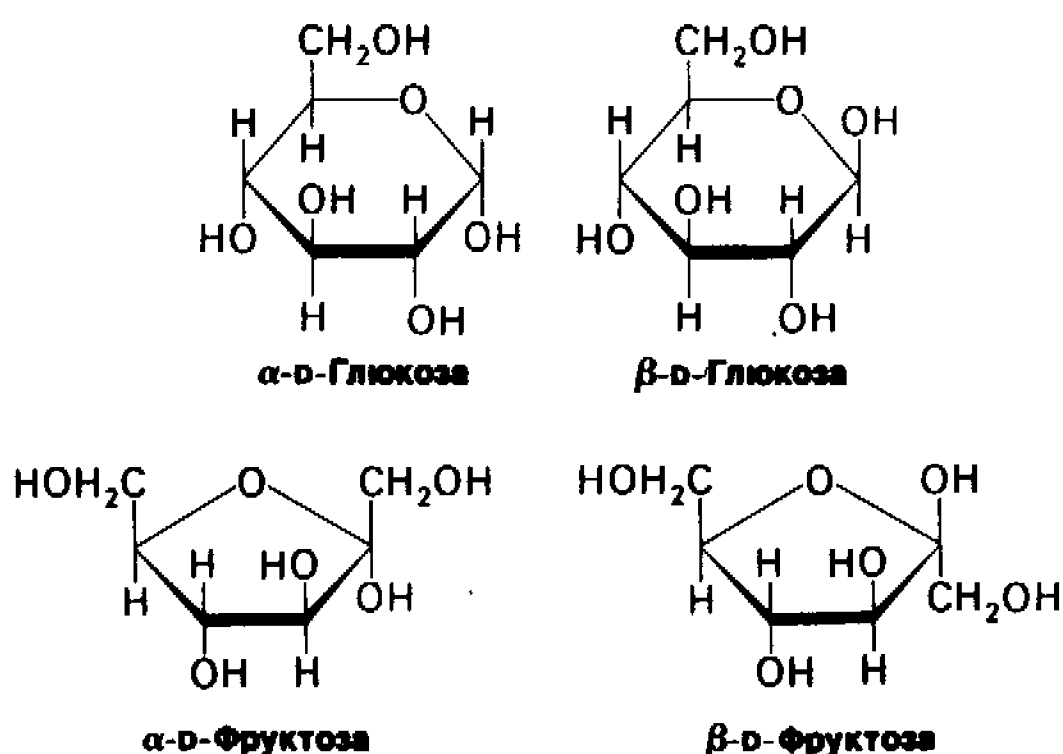
Структурные формулы глюкопиранозы и фруктофуранозы, приведенные в этом разделе, являются проекционными формулами Хаворта (Haworth). В таких формулах углеродные атомы в кольце видны не совсем четко. Примерная плоскость кольца перпендикулярна плоскости бумаги, и край кольца, ближайший к читателю, отмечен жирной линией.



При циклизации глюкозы создается дополнительный асимметрический центр. Таким центром становится в кольцевой форме углерод-1, карбонильный атом углерода в структуре с открытой цепью. Возможно образование двух кольцевых структур: α-D-глюкопиранозы и β-D-глюкопиранозы (рис. 12.4). Символ α *означает, что гидроксильная группа при С-1 расположена под плоскостью кольца, символ* β – *что она находится над плоскостью кольца*. Углерод-1 назван аномерным углеродным атомом, α- и β-формы – *аномерами*.

Такая же номенклатура приложима к кольцевой форме фруктозы, с той лишь разницей, что в этом случае символы α и β относятся к гидроксильной группе при С-2, аномерном углеродном атоме в кетозах.

Альфа-D-глюкопираноза, β-D-глюкопираноза и глюкоза с открытой цепью способны к быстрому взаимопревращению аналогично фуранозе и фруктозе с открытой цепью. В дальнейшем изложении, говоря о глюкозе и фруктозе, мы будем подразумевать равно-



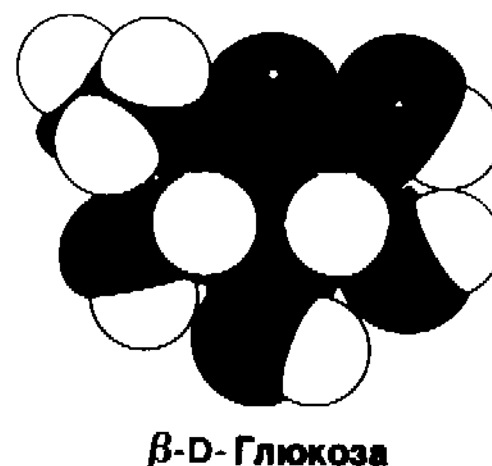


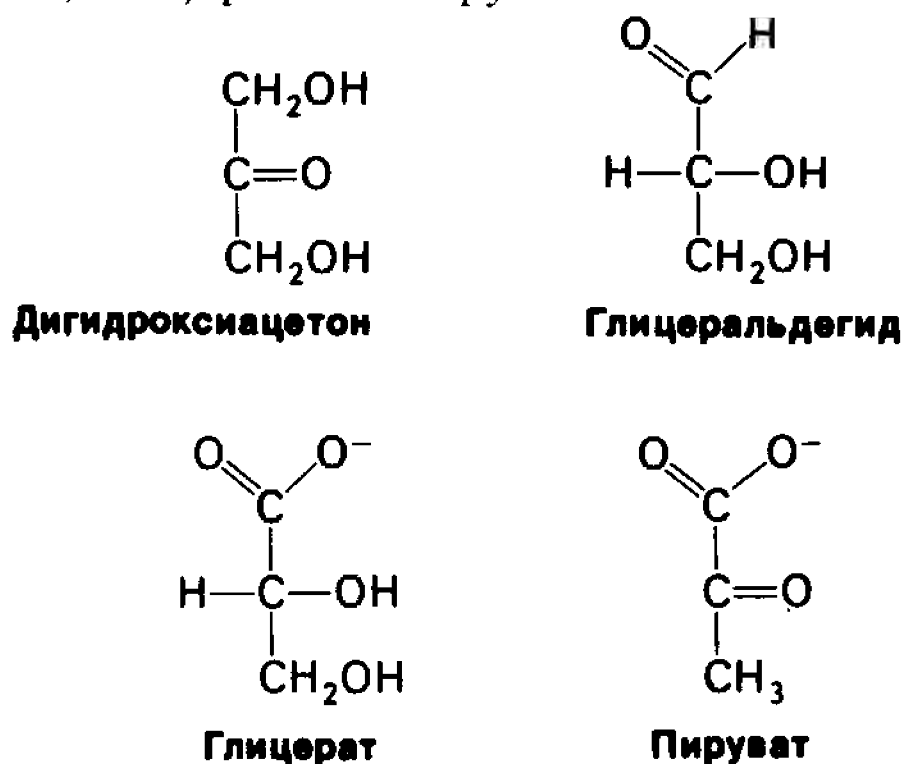
Рис. 12.4. Пространственная модель β-D-глюкозы.

весную смесь молекул с открытой цепью и кольцевых форм этих сахаров.

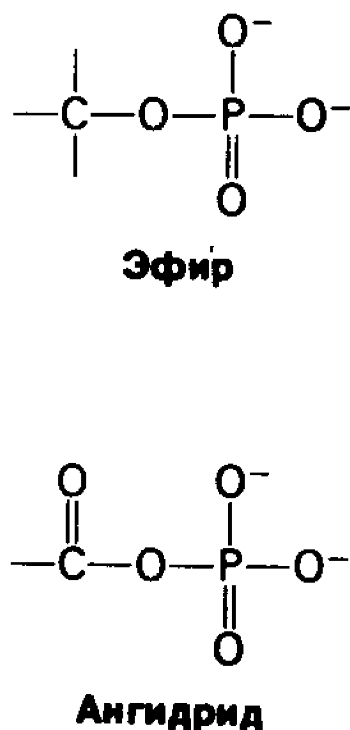
Шестичленное пиранозное кольцо не плоское. Его предпочтительной конформацией является *конформация кресла*. Заместители могут быть двух типов: *аксиальные* и *экваториальные*. В β-D-глюкопиранозе все гидроксильные группы – экваториальные.

12.2. Общий обзор ключевых структур и реакций

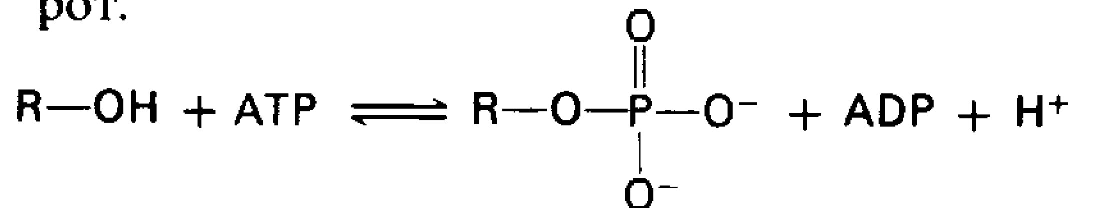
Изучение последовательности реакций в метаболическом пути значительно облегчается, если имеются точные данные о структуре реагирующих веществ и известны типы происходящих реакций. Промежуточные продукты гликолиза состоят из шести или трех углеродных атомов. *Соединения, содержащие шесть атомов углерода*,– это производные *глюкозы* и *фруктозы*; *соединения, содержащие три атома углерода*,– производные *дигидроксиацетона, глицеральдегида, глицерата и пирувата.*



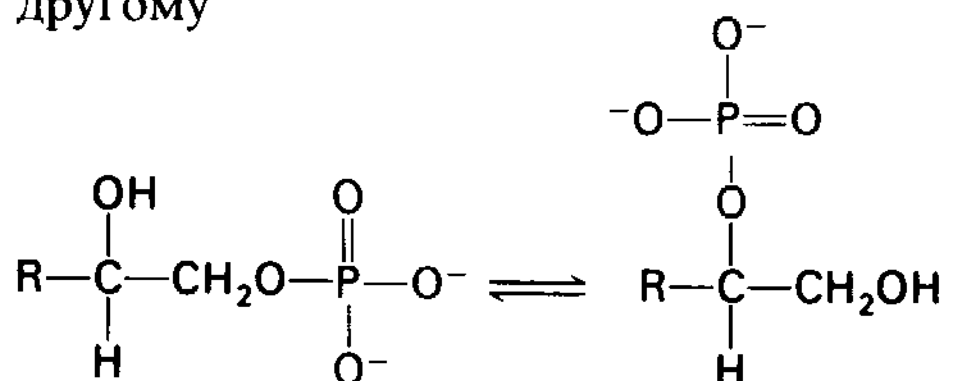
Все промежуточные продукты гликолиза, расположенные в гликолитической последовательности между глюкозой и пируватом, находятся в *фосфорилированной форме*. Фосфорильные группы в этих соединениях связаны *эфирной* или *ангидридной* связью. Рассмотрим теперь некоторые виды реакций, происходящих при гликолизе:



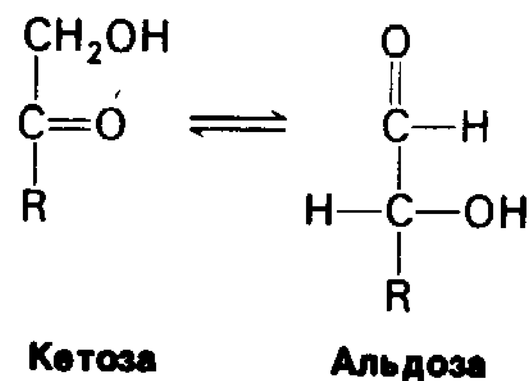
1. *Перенос фосфорильной группы.* Фосфорильная группа переносится от ATP на промежуточный продукт гликолиза или наоборот.



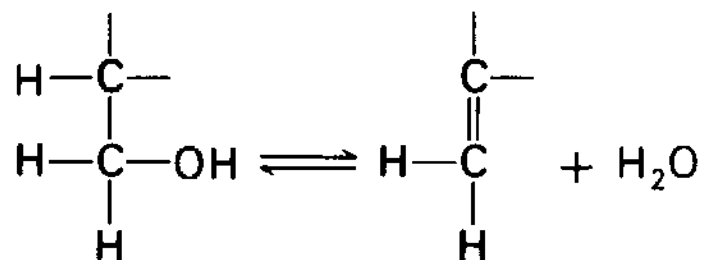
2. *Перемещение фосфорильной группы.* Фосфорильная группа перемещается внутри молекулы от одного кислородного атома к другому



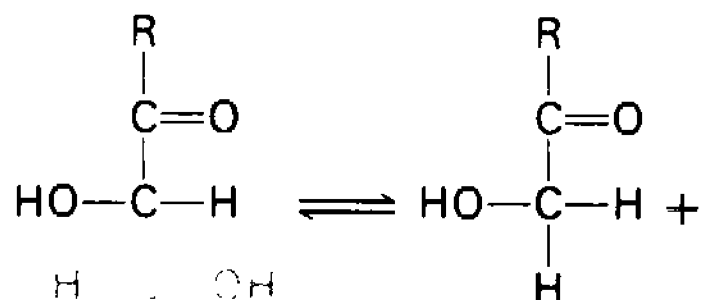
3. *Изомеризация.* Кетоза превращается в альдозу или наоборот



4. *Дегидратация.* Элиминирование молекулы воды.



5. *Альдольное расщепление.* Связь углерод – углерод расщепляется в результате обращения реакции альдольной конденсации.



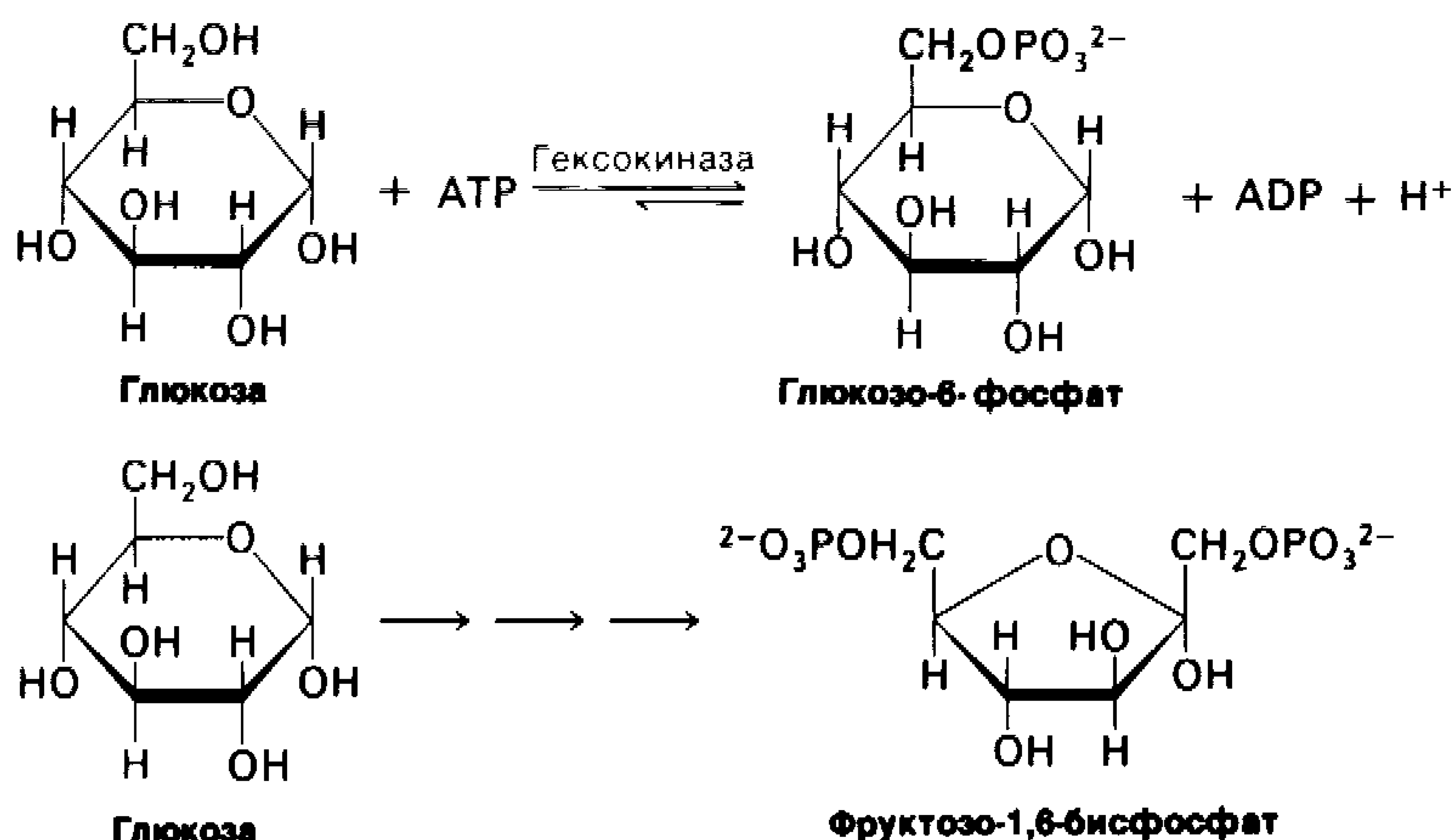
12.3. Образование фруктозо-1,6-бисфосфата из глюкозы

Начнем теперь наше путешествие вниз по гликолитическому пути. Реакции этого пути протекают в цитозоле клетки. Первая стадия, представляющая собою превращение глюкозы во фруктозо-1,6-бисфосфат, происходит в три этапа: фосфорилирование, изомеризация и вторая реакция фосфорилирования. *Стратегия этих начальных ступеней гликолиза* сводится к образованию соединения, *которое может легко расщепляться на фосфорилированные фрагменты, содержащие три углеродных атома.* Из этих трехуглеродных фрагментов на последующих этапах извлекается энергия.

Глюкоза проникает в большинство клеток при помощи специфического переносчика или системы активного транспорта (разд. 36.12). *Судьба глюкозы внутри клетки однозначна: она фосфорилируется при участии АТР с образованием глюкозо-6-фосфата.* Перенос фосфорильной группы с АТР к гидроксильной группе при С-6 глюкозы катализируется *гексокиназой.*



Рис. 12.5. Электронная микрофотография печеночной клетки. Гликолиз происходит в цитозоле. (Печатается с любезного разрешения д-ра Anne Hubbard.)



Перенос фосфорильной группы – это основная реакция в биохимии. Фермент, катализирующий перенос фосфорильной группы от АТР к акцептору, называется *киназой.* Следовательно, гексокиназа – это фермент, способный переносить фосфорильную группу от АТР к различным шестиуглеродным сахарам (*гексозам*). Гексокиназа, подобно всем другим киназам, нуждается для проявления своей активности в ионе Mg^{2+} (или другом двухвалентном ионе металла, таком, как Mn^{2+}). Двухвалентные ионы образуют комплекс с АТР. Структура двух возможных комплексов Mg^{2+} – АТР показана на рис. 12.7.

Следующий этап гликолиза – это *изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат. Шестичленное пиранозное кольцо* глюкозо-6-фосфата превращается в *пятичленное фуранозное кольцо* фруктозо-6-фосфата. Напомним, что у глюкозы с открытой цепью при С-1 находится альдегидная группа, тогда как для фруктозы с открытой цепью характерно наличие кетогруппы при С-2. Альдегид при С-1 реагирует с гидрок-

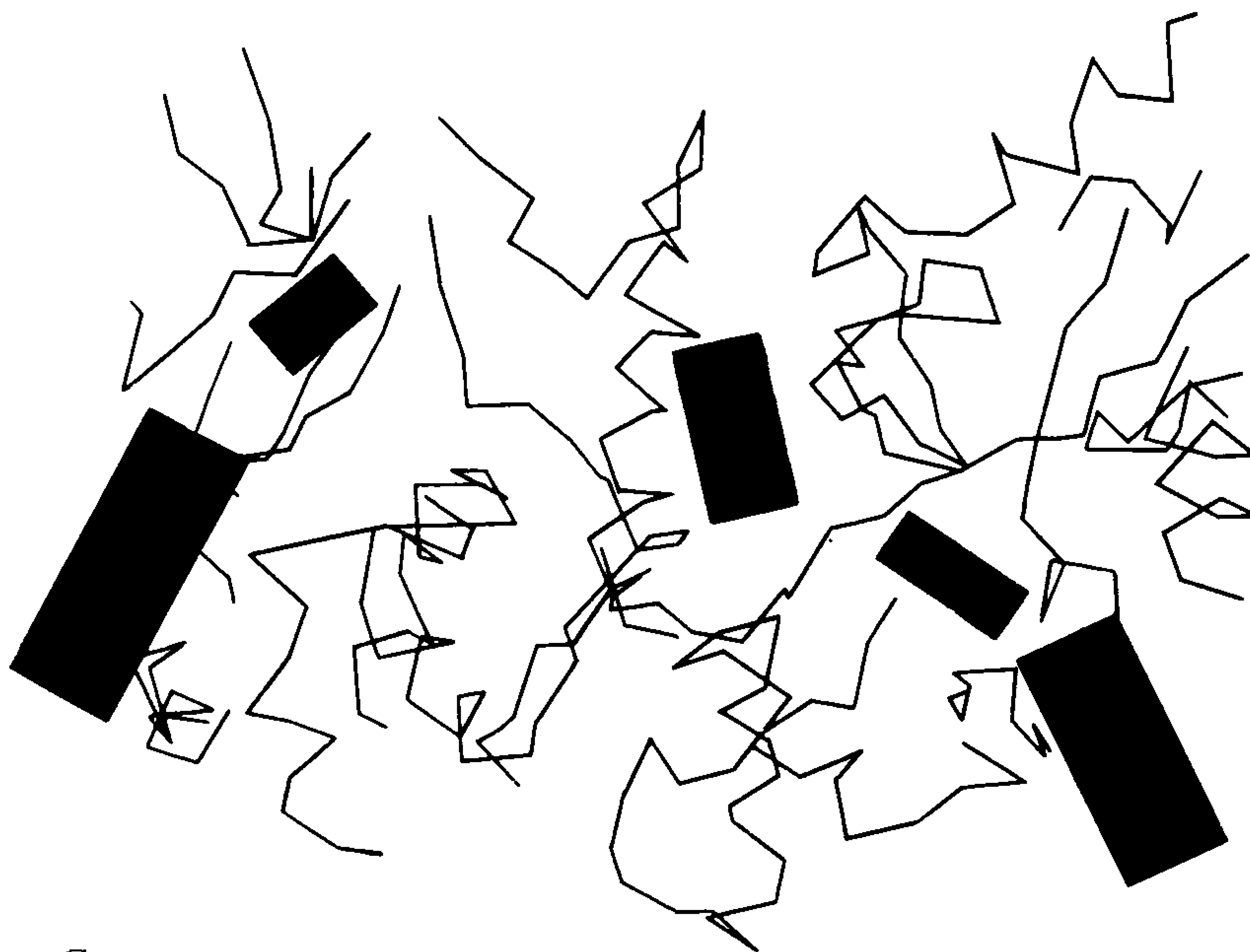


Рис. 12.6. Схематическое изображение α-углеродного скелета дрожжевой гексокиназы. Две идентичные субъединицы этого димерного фермента несимметрично взаимодействуют друг с другом. Глюкоза (окрашено зеленым) и АТР (окрашено красным) связаны с каталитическим центром каждого димера. Дополнительная молекула АТР (окрашено синим) связана на границе между субъединицами. (Печатается с любезного разрешения д-ра Thomas Steitz.)

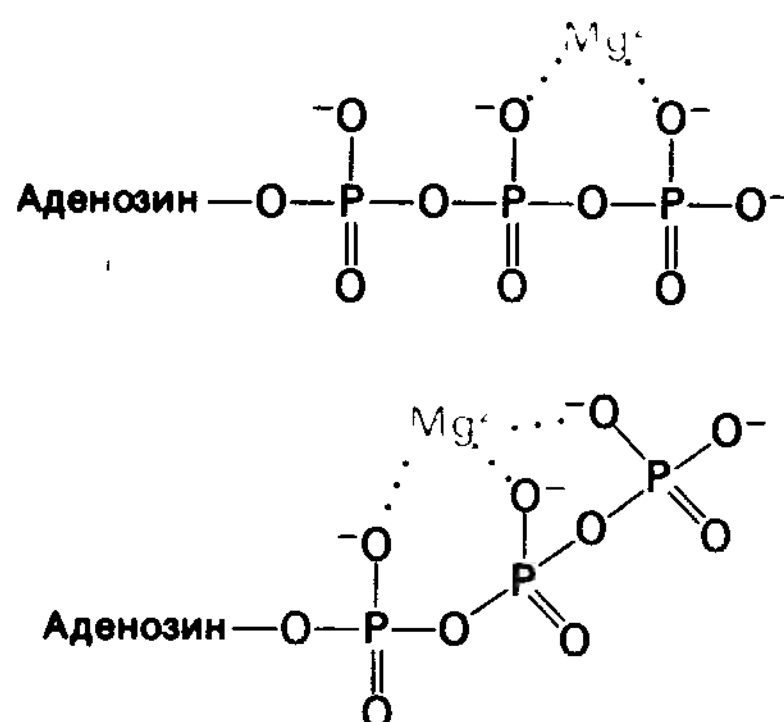
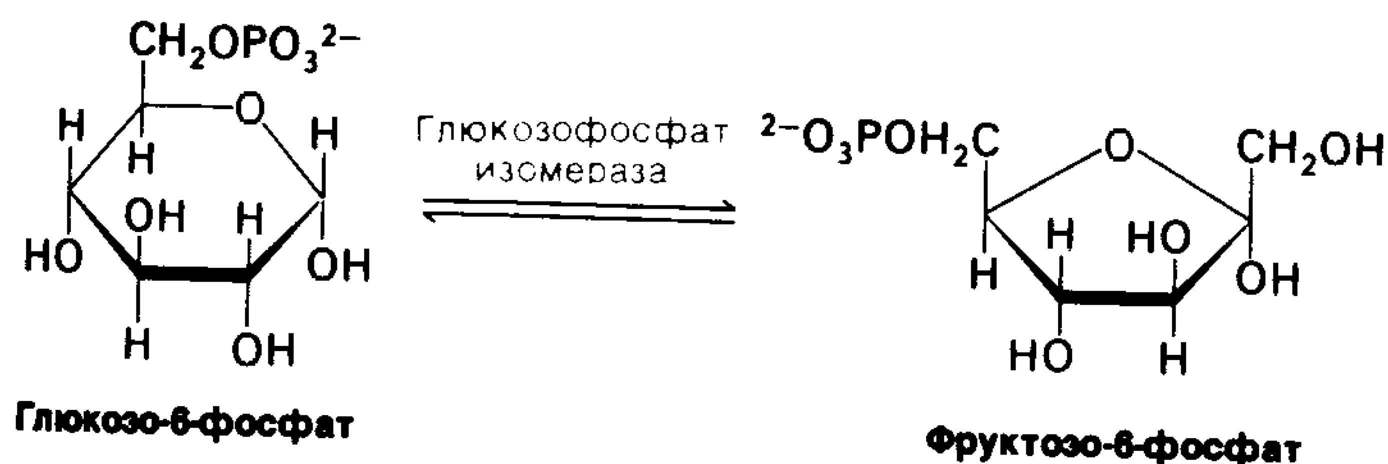
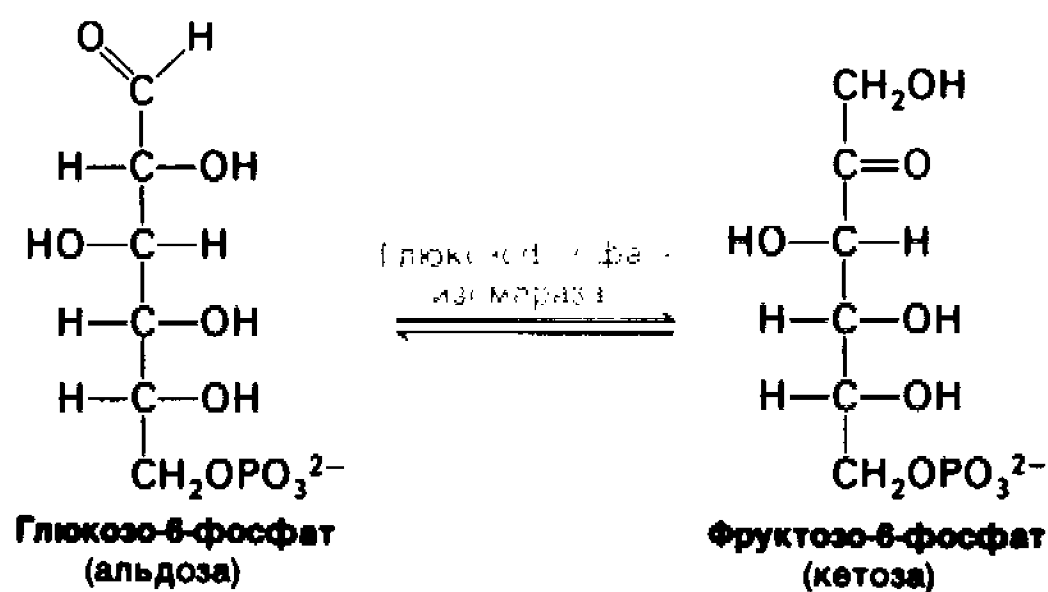


Рис. 12.7. Способы связывания Mg^{2+} с АТР.

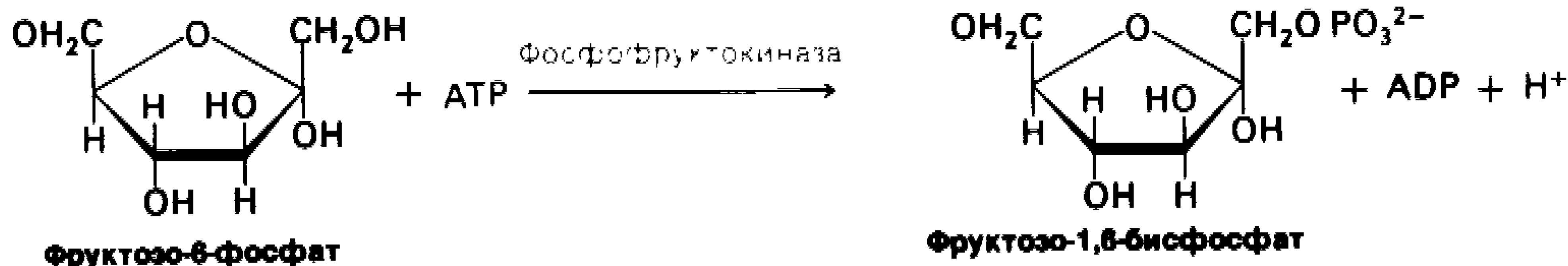
сильной группой при С-5, образуя пиранозное кольцо, а кетогруппа при С-2 взаимодействует с гидроксильной группой при С-5 с образованием фуранозного кольца. Эта изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат представляет собою *превращение альдозы в кетозу.*

Смысл данной реакции станет понятен, если подставить в это уравнение формы сахаров с открытой цепью.





За стадией изомеризации следует вторая реакция фосфорилирования. *Фруктозо-6-фосфат фосфорилируется за счет ATP с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата.*



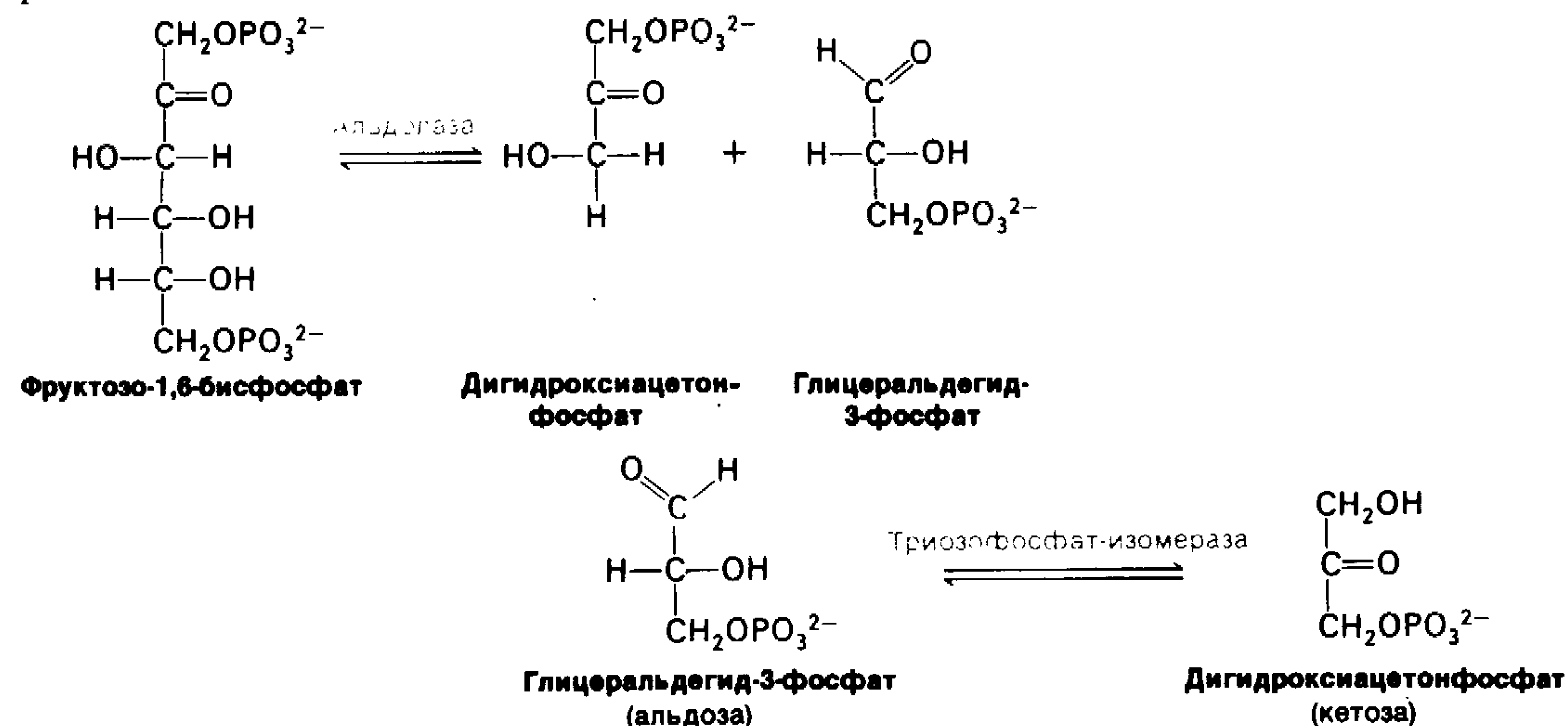
Реакция катализируется аллостерическим ферментом *фосфофруктокиназой.* Ход гликолиза лимитируется уровнем активности этого фермента. Каталитическая активность фосфофруктокиназы находится под аллостерическим контролем со стороны ATP и некоторых других метаболитов (разд. 12.9).

12.4. Образование глицеральдегид-3-фосфата путем расщепления и изомеризации

Вторая стадия гликолиза состоит из четырех этапов и начинается с расщепления фруктозо-1,6-бисфосфата с образованием *глицеральдегид-3-фосфата* и *дигидроксиацетонфосфата.* В дальнейших реакциях гликолиза участвуют трехуглеродные, а не шестиуглеродные соединения.

Это превращение катализируется *альдолазой.* Название фермента отражает природу обратной реакции, представляющей собою альдольную конденсацию.

Глицеральдегид-3-фосфат стоит на «столбовом пути» гликолиза. К дигидроксиацетонфосфату это не относится. Однако дигидроксиацетонфосфат может легко превращаться в глицеральдегид-3-фосфат. Эти соединения являются изомерами: дигидроксиацетонфосфат – кетоза, а глицеральдегид-3-фосфат – альдоза. Изомеризация указанных трехуглеродных фосфорилированных сахаров катализируется *триозофосфат-изомеразой.* Реакция характеризуется большой быстротой и обратимостью. В состоянии равновесия 96% триозофосфатов приходится на долю дигидроксиацетонфосфата. Тем не менее превращение дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат протекает легко, поскольку последний эффективно удаляется.



Фруктозо-1,6-бисфосфат —Альдолаза→ Глицеральдегид-3-фосфат + Дигидроксиацетонфосфат

Глицеральдегид-3-фосфат ⇌ Дигидроксиацетонфосфат (…изомераза)

Таким образом, две молекулы глицеральдегид-3-фосфата образуются из одной молекулы фруктозо-1,6-бисфосфата при последовательном действии альдолазы и триозофосфат-изомеразы

12.5. Хранение энергии: фосфорилирование, сопряженное с окислением глицеральдегид-3-фосфата

На предыдущих стадиях гликолиза происходило превращение одной молекулы глюкозы в две молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Извлечение энергии при этом еще не имело места. Напротив, на этой стадии расходовалось две молекулы ATP. Мы переходим теперь к ряду стадий, на которых происходит потребление энергии, содержащейся в глицеральдегид-3-фосфате.

$$\mathrm{O{=}C(H)\!-\!C(H)(OH)\!-\!CH_2OPO_3^{2-}}$$

Глицеральдегид-3-фосфат

$$\mathrm{O{=}C(OPO_3^{2-})\!-\!C(H)(OH)\!-\!CH_2OPO_3^{2-}}$$

1,3-бисфосфоглицерат (1,3-БФГ)

Начальная реакция в этой последовательности представляет собою *превращение глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат* (1,3-БФГ), *катализируемое глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой*

Глицеральдегид-3-фосфат $+ \mathrm{NAD^+} +$
$+ P_i \rightleftharpoons$ 1,3-БФГ $+ \mathrm{NADH} + \mathrm{H^+}$.

При этой окислительно-восстановительной реакции происходит генерирование *высокоэнергетического фосфатного соединения.* Альдегидная группа при С-1 превращается в *ацилфосфат – смешанный ангидрид* фосфорной и карбоновой кислот.

$$\mathrm{R{-}C({=}O){-}O{-}P({=}O)(O^-){-}O^-}$$

Ацилфосфат

Энергия, необходимая для образования этого ангидрида, имеющего высокий потенциал переноса фосфатной группы, высвобождается при окислении альдегидной группы. Заметим, что С-1 в 1,3-БФГ находится на окислительном уровне карбоновой кислоты. Образование 1,3-БФГ представляет собой пример *фосфорилирования на субстратном уровне.* Механизм этой сложной реакции, в которой окисление сопряжено с фосфорилированием, мы рассмотрим несколько позднее (разд. 12.14).

12.6. Образование ATP из 1,3-бисфосфоглицерата

На следующем этапе гликолиза высокий потенциал переноса фосфорильной группы, присущий 1,3-БФГ, используется для генерирования ATP. И действительно, это первая реакция гликолиза, в которой происходит образование ATP. Перенос фосфорильной группы от ацилфосфатной группы 1,3-БФГ на ADP катализируется *фосфоглицераткиназой.* В качестве продуктов реакции образуются ATP и 3-фосфоглицерат.

$$\mathrm{O{=}C(OPO_3^{2-})\!-\!C(H)(OH)\!-\!CH_2OPO_3^{2-}} + \mathrm{ADP} \xrightleftharpoons{\text{…киназа}} \mathrm{O{=}C(O^-)\!-\!C(H)(OH)\!-\!CH_2OPO_3^{2-}} + \mathrm{ATP}$$

1,3-бисфосфоглицерат → 3-фосфоглицерат

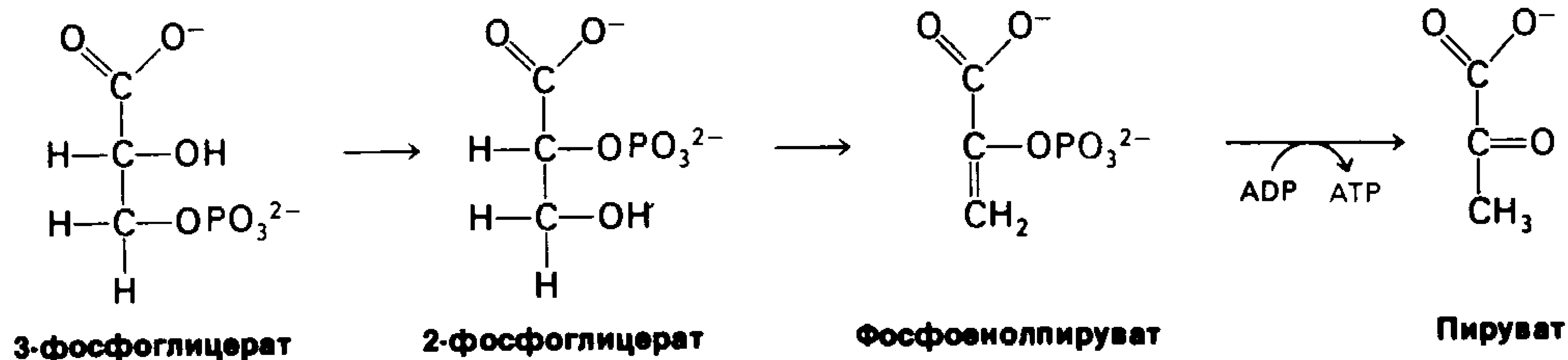
Таким образом, в результате реакций, катализируемых глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой и фосфоглицераткиназой, происходят следующие процессы.

1. Глицеральдегид-3-фосфат, альдегид, окисляется в 3-фосфоглицерат, карбоновую кислоту.
2. NAD^+ восстанавливается в NADH.
3. Из P_i и ADP образуется ATP.

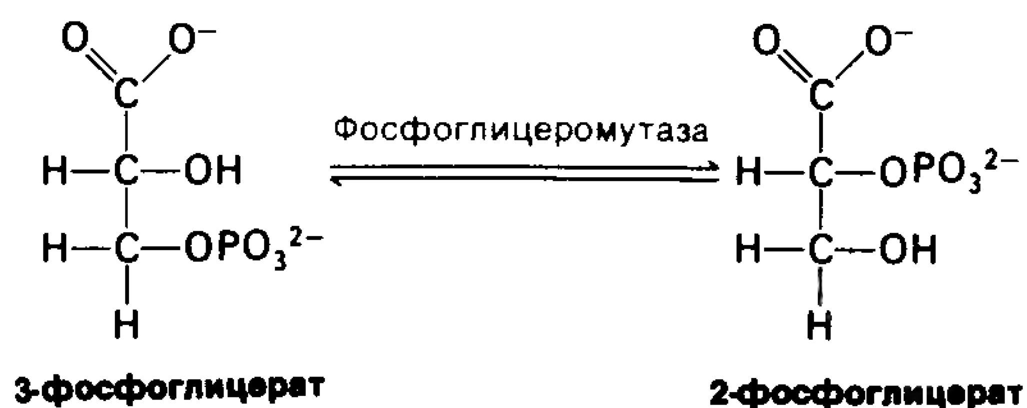
12.7. Образование пирувата и генерирование второй молекулы ATP

Мы подошли теперь к последней стадии гликолиза. Она осуществляется в три этапа, в результате которых происходит превращение 3-фосфоглицерата в пируват и образование второй молекулы ATP.

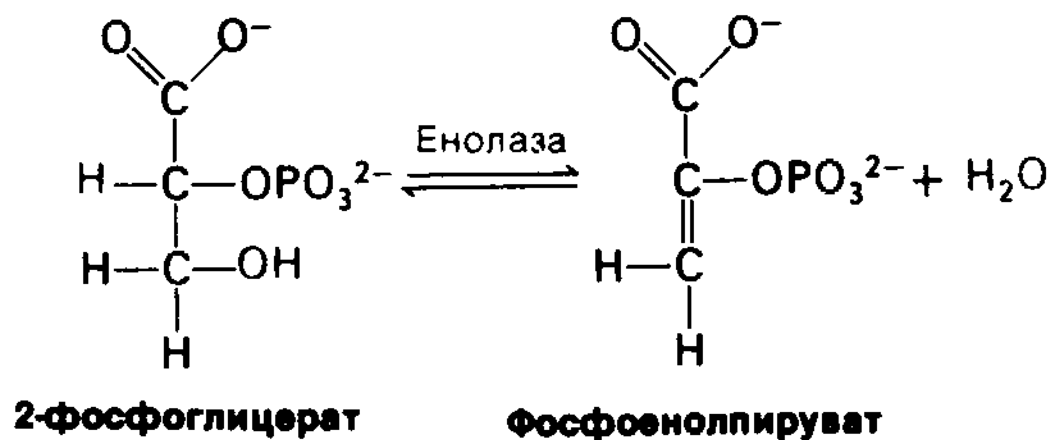
Первая из этих реакций представляет со-



бою внутримолекулярную перестройку. При превращении *3-фосфоглицерата* в *2-фосфоглицерат*, катализируемом *фосфоглицеромутазой*, происходит перемещение фосфорильной группы. Вообще мутазой называют фермент, катализирующий внутримолекулярные перемещения химических групп, таких, как фосфорильная группа.



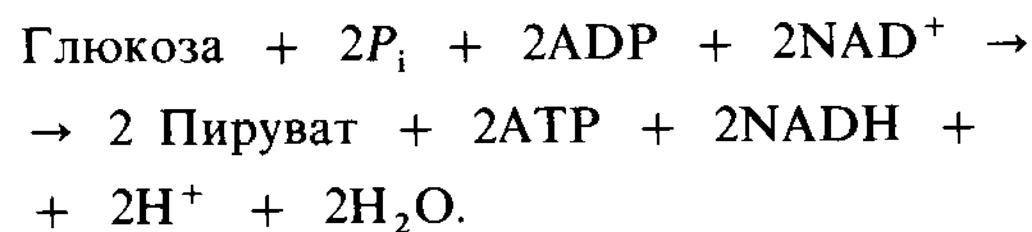
Вторая реакция состоит в образовании *енола* в результате дегидратации 2-фосфоглицерата. Образование *фосфоенолпирувата* катализируется *енолазой*. Потенциал переноса фосфорильной группы в результате реакции дегидратации значительно повышается. *Енолфосфат* характеризуется высоким потенциалом переноса фосфорильной группы, тогда как в случае фосфатного эфира обычного спирта этот потенциал находится на низком уровне. Причины указанного различия мы рассмотрим позднее.



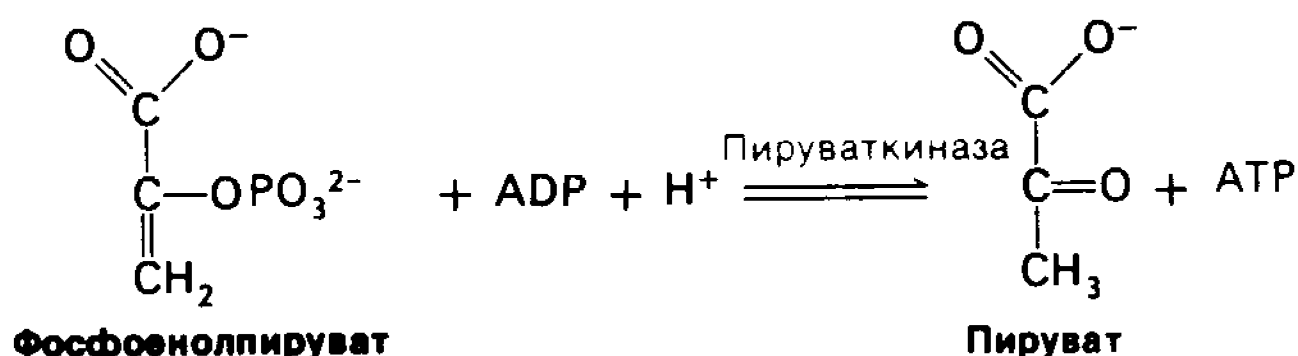
Последняя реакция—*образование пирувата* с одновременным образованием *ATP*. Перенос фосфорильной группы от фосфоенолпирувата к ADP катализируется *пируваткиназой*. Это фосфорилирование не является окислительным в противоположность реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой.

12.8. Выход энергии при превращении глюкозы в пируват

Суммарная реакция превращения глюкозы в пируват имеет следующий вид:



Глюкоза + $2P_i$ + 2ADP + $2NAD^+$ →
→ 2 Пируват + 2ATP + 2NADH +
+ $2H^+$ + $2H_2O$.



Таким образом, *в ходе превращения глюкозы в пируват происходит образование двух молекул ATP.* Суммарный перечень этапов, на которых происходит потребление или образование ATP, приведен в табл. 12.1. Напомним, что из фруктозо-1,6-бисфосфата образуются два трехуглеродных компонента. Реакции гликолиза суммированы в табл. 12.2 и на рис. 12.8.

Таблица 12.1. **Потребление и образование ATP при гликолизе**

Реакция	Изменение количества ATP в расчете на 1 молекулу глюкозы
Глюкоза → Глюкозо-6-фосфат	−1
Фруктозо-6-фосфат → → Фруктозо-1,6-бисфосфат	−1
2 1,3-бисфосфоглицерат → → 2 3-фосфоглицерат	+2
2 Фосфоенолпируват → → 2 Пируват	+2
Итого:	+2

12.9. Фосфофруктокиназа – ключевой фермент в регуляции гликолиза

Гликолитический путь играет двоякую роль: он приводит к генерированию ATP в результате расщепления глюкозы, и он же поставляет строительные блоки для реакций синтеза, таких, как образование жирных кислот с длинной цепью. Скорость превращения глюкозы в пируват регулируется таким образом, чтобы удовлетворять этим

Таблица 12.2. **Реакции гликолиза**

Стадия	Реакция	Фермент	Тип[1]	$\Delta G^{0'}$ [2]	ΔG [2]
1	Глюкоза + ATP → Глюкозо-6-фосфат + + ADP + H^+	Гексокиназа	а	− 4,0	− 8,0
2	Глюкозо-6-фосфат ⇌ Фруктозо-6-фосфат	Фосфоглюкозо-изомераза	в	+ 0,4	− 0,6
3	Фруктозо-6-фосфат + ATP → Фруктозо-1,6-бисфосфат + ADP + H^+	Фосфофруктокиназа	а	− 3,4	− 5,3
4	Фруктозо-1,6-бисфосфат ⇌ Дигидроксиацетонфосфат + Глицеральдегид-3-фосфат	Альдолаза	д	+ 5,7	− 0,3
5	Дигидроксиацетонфосфат ⇌ Глицеральдегид-3-фосфат	Триозофосфат-изомераза	в	+ 1,8	+ 0,6
6	Глицеральдегид-3-фосфат-P_i + NAD^+ ⇌ 1,3-бисфосфоглицерат + NADH + H^+	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	е	+ 1,5	− 0,4
7	1,3-бисфосфоглицерат + ADP ⇌ 3-фосфоглицерат + ATP	Фосфоглицерат-киназа	а	− 4,5	+ 0,3
8	3-фосфоглицерат ⇌ 2-фосфоглицерат	Фосфоглицеро-мутаза	б	+ 1,1	+ 0,2
9	2-фосфоглицерат ⇌ фосфоенолпируват + H_2O	Енолаза	г	+ 0,4	− 0,8
10	Фосфоенолпируват + ADP + H^+ → Пируват + ATP	Пируваткиназа	а	− 7,5	− 4,0

[1] *Типы реакций*: а – перенос фосфорильной группы; б – перемещение фосфорильной группы; в – изомеризация; г – дегидратация; д – альдольное расщепление; е – фосфорилирование, сопряженное с окислением.

[2] $\Delta G^{0'}$ и ΔG выражены в ккал/моль. ΔG – истинное изменение свободной энергии, вычислено из $\Delta G^{0'}$ и известной концентрации реагирующих веществ при обычных физиологических условиях.

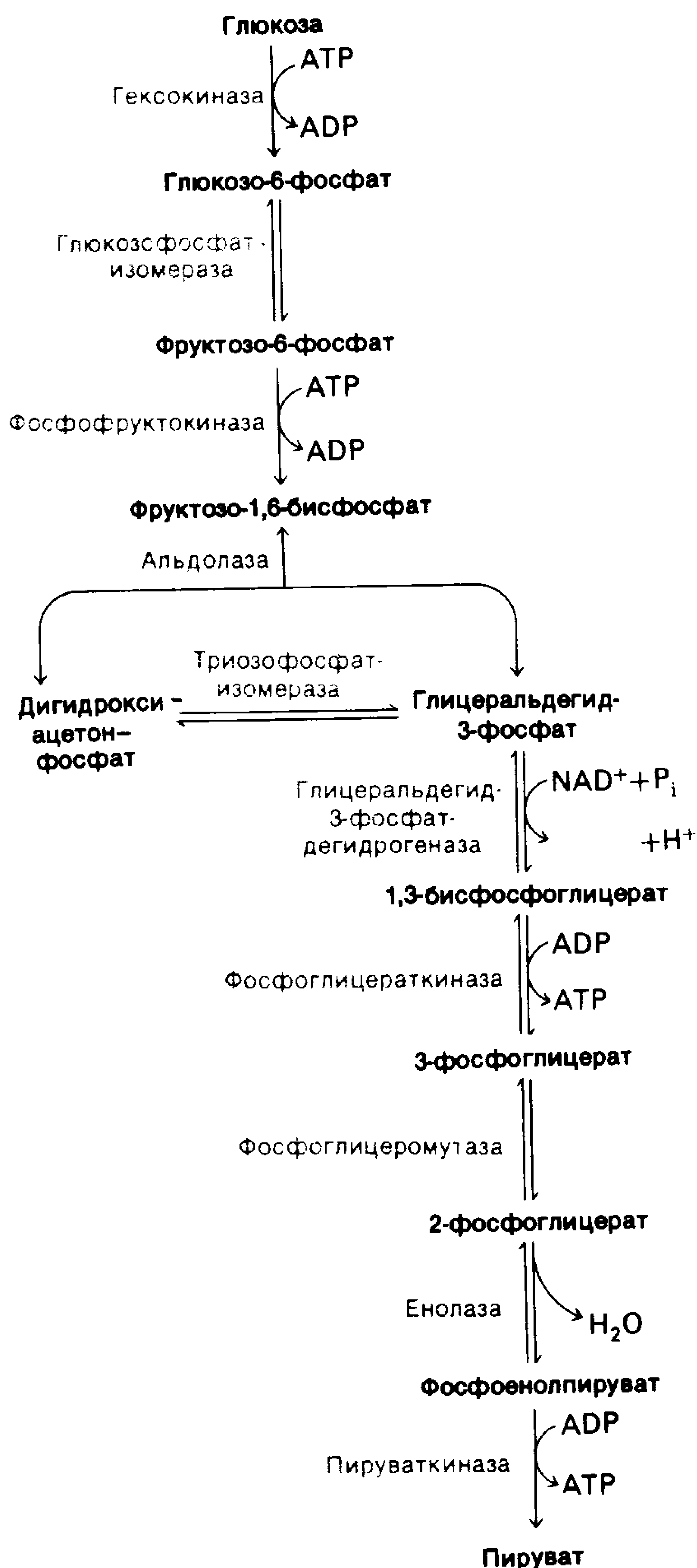


Рис. 12.8. Гликолитический путь.

двум главным потребностям клетки. В метаболических путях *ферменты, катализирующие по существу необратимые реакции, играют роль потенциальных участков контроля*. При гликолизе реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой, фактически необратимы



Рис. 12.9. Аллостерическая регуляция фосфофруктокиназы. Высокая концентрация ATP ингибирует фермент, понижая его сродство к фруктозо-6-фосфату. AMP снижает, а цитрат усиливает ингибирующее действие ATP.

и, по-видимому, могут играть и регуляторную, и каталитическую роль. Все три фермента действительно являются теми участками регуляции метаболического пути, на котором осуществляется регуляция гликолитического процесса.

Фосфофруктокиназа – наиболее важный регуляторный компонент гликолиза. Этот тетрамерный фермент *ингибируется высокими концентрациями* ATP, снижающими его сродство к фруктозо-6-фосфату. Если реакция протекает в присутствии высоких концентраций ATP, то кинетика фосфофруктокиназной реакции описывается не гиперболической кривой, а сигмоидной (рис. 12.9). Этот аллостерический эффект усиливается при связывании ATP с высокоспецифичным регуляторным центром, локализованным отдельно от каталитического центра. Ингибиторный эффект ATP обращается под действием AMP. *Следовательно, активность фермента возрастет при снижении отношения* [*ATP*]/[*AMP*]. Другими словами, *гликолиз стимулируется в условиях низкого энергетического заряда клетки*. Как уже упоминалось, гликолиз поставляет также углеродный скелет для процессов биосинтеза. Следовательно, регуляторное действие на фосфофруктокиназу будут, очевидно, оказывать также сигналы об избытке или недостатке строительных блоков. Действительно, *фосфофруктокиназа ингибируется цитратом*, ранним промежуточным продуктом в цикле трикарбоновых кислот (разд. 13.2). Высокое содержание цитрата

означает, что соединения, играющие при биосинтезе роль предшественников, присутствуют в избытке и дополнительного распада глюкозы для этой цели не требуется. Цитрат подавляет активность фосфофруктокиназы, усиливая ингибиторное действие АТР. *Таким образом, фосфофруктокиназа наиболее активна, когда клетка нуждается и в энергии, и в строительных блоках, о чем сигнализируют низкое значение отношения [ATP]/[AMP] и низкое содержание цитрата. Фермент обладает умеренной активностью в условиях, когда существует потребность либо в энергии, либо в углеродном скелете. Если оба эти фактора присутствуют в избытке, активность фосфофруктокиназы падает почти до нуля.*

Гексокиназа и пируваткиназа также участвуют в регуляции скорости гликолиза. Пируваткиназа мышц и печени аллостерически ингибируется АТР, и, таким образом, превращение фосфоенолпирувата в пируват блокируется в условиях высокого энергетического заряда. Гексокиназа аллостерически ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Содержание фруктозо-6-фосфата повышается при подавлении активности фосфофруктокиназы; при этом происходит соответствующее увеличение количества глюкозо-6-фосфата, который находится в равновесии с фруктозо-6-фосфатом. *Следовательно, ингибирование фосфофруктокиназы высоким отношением [ATP]/[AMP] или высоким содержанием цитрата приводит к ингибированию гексокиназы.* В печени глюкоза фосфорилируется в глюкозо-6-фосфат даже при высокой концентрации последнего, что обусловливается присутствием *глюкокиназы* – фермента, отличного от гексокиназы. Глюкокиназа характеризуется высоким значением $K_м$ для глюкозы, и следовательно она активна только в условиях избытка глюкозы. Роль глюкокиназы состоит в том, чтобы поставлять глюкозо-6-фосфат для синтеза гликогена, резервной формы глюкозы (гл. 16). Высокая $K_м$ глюкокиназы печени дает возможность мозгу и мышцам первыми использовать глюкозу при ее ограниченном поступлении.

Почему ведущую роль в гликолизе играет фосфофруктокиназа, а не гексокиназа? Это станет понятным, если вспомнить, что глюкозо-6-фосфат является промежуточным продуктом не только гликолитического пути. Он может также превращаться в гликоген или окисляться по пентозофосфатному пути (гл. 15) с образованием NADPH. Первая необратимая реакция, присущая только гликолитическому пути, названная *решающим этапом*, это фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат. Отсюда вытекает значение фосфофруктокиназы как основного фактора регуляции гликолиза. *Вообще фермент, катализирующий решающий этап в метаболической последовательности, всегда является наиболее важным регуляторным элементом данного пути.*

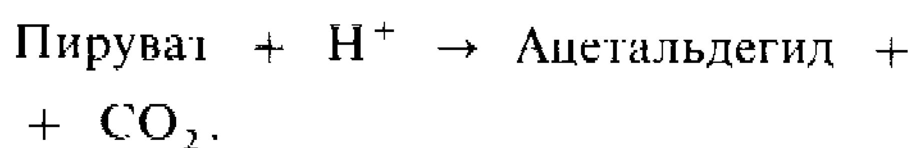


Рис. 12.10. Электронная микрофотография дрожжевой клетки. (Печатается с любезного разрешения Lynne Mercer.)

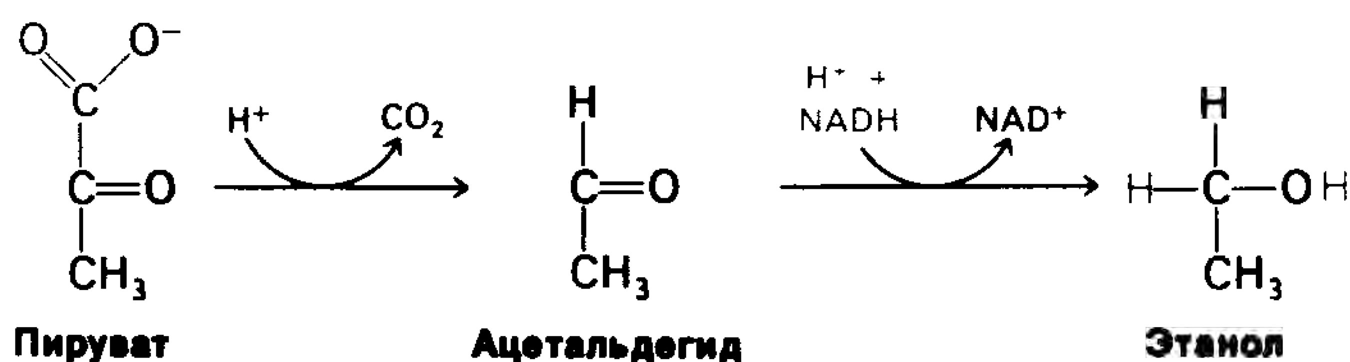
12.10. Пируват может превращаться в этанол, лактат или ацетилкофермент А

Последовательность реакций превращения глюкозы в пируват очень схожа у всех организмов и во всех видах клеток. В противоположность этому судьба пирувата в процессах генерирования энергии обмена веществ различна. Мы рассмотрим три реакции, протекающие с участием пирувата.

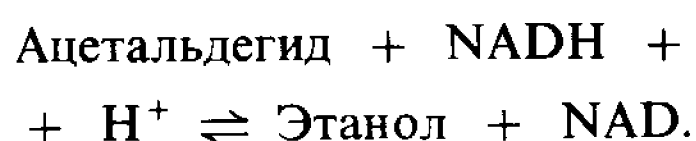
1. *Этанол* образуется из пирувата у дрожжей и некоторых других микроорганизмов. На первой стадии происходит декарбоксилирование пирувата:



$$\text{Пируват} + H^+ \rightarrow \text{Ацетальдегид} + CO_2.$$

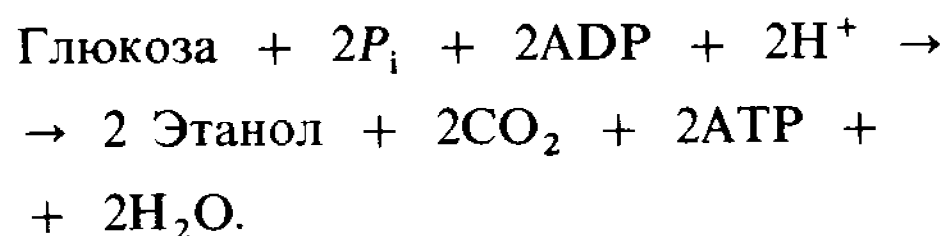


Реакция катализируется пируват-декарбоксилазой, которая содержит в качестве кофермента тиаминпирофосфат. Тиаминпирофосфат является коферментом многих декарбоксилаз (обсуждение механизма действия см. в разд. 13.10). Вторая стадия состоит в восстановлении ацетальдегида в этанол за счет NADH. Эта окислительно-восстановительная реакция катализируется *алкоголь-дегидрогеназой*, содержащей в активном центре ион цинка.



$$\text{Ацетальдегид} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Этанол} + \text{NAD}.$$

Превращение глюкозы в этанол называется *спиртовым брожением*. Суммарная реакция этого анаэробного процесса имеет следующий вид:

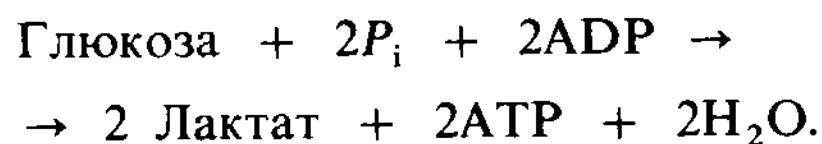


$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2\text{ADP} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\ \text{Этанол} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}.$$

Важно отметить, что NAD^+ и NADH не входят в это суммарное уравнение. Восстановление ацетальдегида в этанол приводит к регенерированию NAD^+, который используется в реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой. Таким образом, в суммарной реакции превращения глюкозы в этанол нет окислительно-восстановительного процесса.

2. *Лактат* образуется из пирувата в норме у многих микроорганизмов. Реакция имеет место также в клетках высших организмов при ограниченном поступлении кислорода (как в интенсивно работающей мышце). Восстановление пирувата за счет NADH с образованием лактата катализируется лактат-дегидрогеназой:

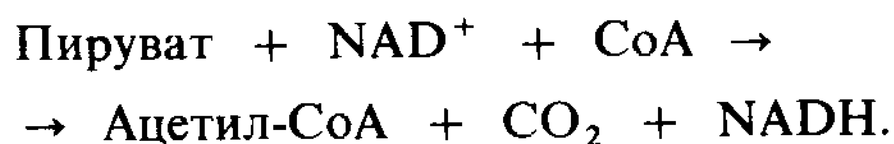
Суммарная реакция превращения глюкозы в лактат такова:



$$\text{Глюкоза} + 2P_i + 2\text{ADP} \rightarrow 2\ \text{Лактат} + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}.$$

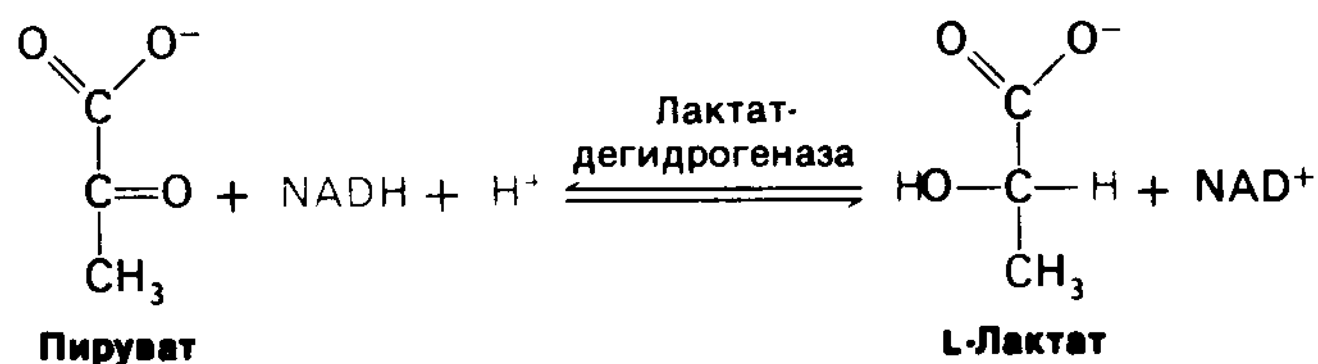
Как и в случае спиртового брожения, окислительно-восстановительного процесса в суммарной реакции нет. NADH, образующийся в результате окисления глицеральдегид-3-фосфата, потребляется при восстановлении пирувата. ***Регенерирование NAD^+ при восстановлении пирувата в лактат поддерживает в анаэробных условиях непрерывное течение гликолитического процесса.*** Если бы регенерирования NAD^+ не происходило, гликолиз не мог бы идти дальше образования глицеральдегид-3-фосфата, а следовательно, не происходило бы и образования ATP. На самом деле синтез лактата требует времени, что мы увидим в гл. 15.

3. Только небольшая часть содержащейся в глюкозе энергии высвобождается при ее анаэробном превращении в лактат (или этанол). Значительно большее количество энергии извлекается в аэробных условиях в цикле трикарбоновых кислот и в цепи переноса электронов. Включение в этот окислительный путь происходит на уровне («пункт входа») *ацетил-кофермента А* (ацетил-СоА), который образуется в митохондриях при окислительном декарбоксилировании пирувата:



$$\text{Пируват} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{Ацетил-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}.$$

Реакция катализируется пируват-дегидрогеназным комплексом. (Более подробно она рассматривается в следующей главе.)



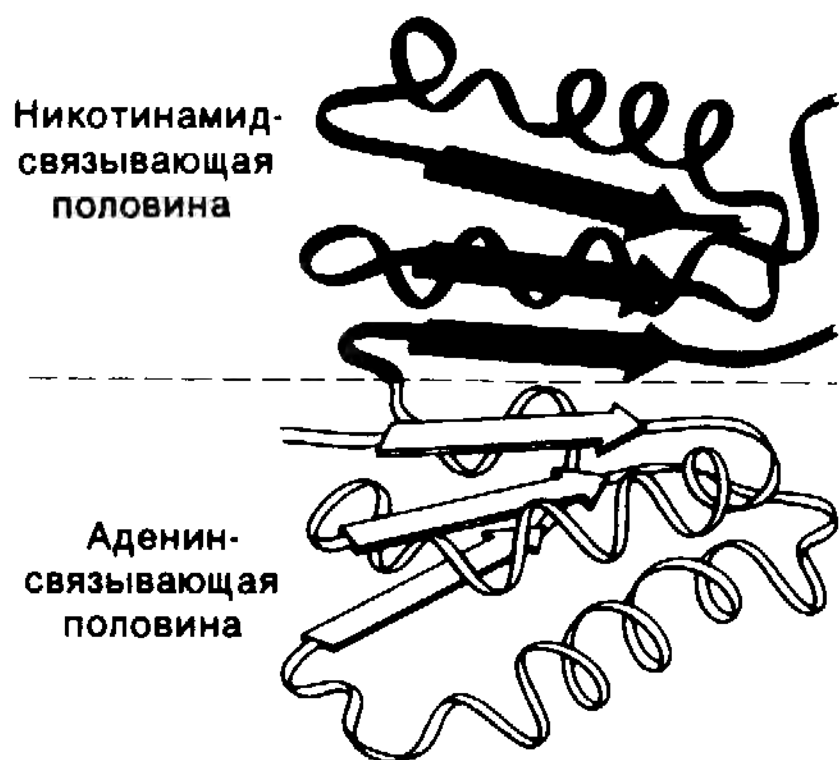


Рис. 12.11. Схематическое изображение участка дегидрогеназ, связывающего NAD^+. Половина этого участка, связывающая NAD^+ (окрашена зеленым), подобна по структуре половине, связывающей аденин (окрашено желтым). (Rossmann M. G., Liljas A., Brändén C.-I., Banaszak L. J., The Enzymes, 3 rd ed., v. 10, Academic Press, p. 68, 1975.)

NAD^+, необходимый для этой реакции и для окисления глицеральдегид-3-фосфата, регенерирует на последнем этапе переноса электронов NADH на O_2 по цепи переноса электронов в митохондриях.

12.11. Участки связывания NAD^+ очень сходны в различных дегидрогеназах

Лактат-дегидрогеназа из скелетных мышц, представляющая собою тетрамер с мол. массой 140 кДа, и алкоголь-дегидрогеназа, димер с мол. массой 84 кДа, обладают совершенно различной трехмерной структурой. Однако участки связывания NAD^+ у них обнаруживают поразительное сходство (рис. 12.11). NAD^+-связывающая область состоит из четырех α-спиралей и шести тяжей из параллельных β-слоев. Конформации NAD^+ при связывании с лактат-дегидрогеназой и алкоголь-дегидрогеназой также почти одинаковы. Аденозиновый компонент NAD^+ связывается в гидрофобной щели. В отличие от этого никотинамидный компонент связывается таким образом, что реакционноспособная сторона кольца оказывается в полярном окружении, тогда как другая сторона приходит в контакт с гидрофобными остатками фермента.

Связанный NAD^+ имеет вытянутую конформацию (рис. 12.12), адениновое и никотинамидное кольца отстоят друг от друга на 14 Å. Трехмерная структура глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и малат-дегидрогеназы (фермент цикла трикарбоновых кислот, разд. 13.9) также установлена с высокой степенью разрешения. Их



Рис. 12.12. Модель NAD^+. Приведена конформация, обнаруженная при исследовании NAD^+, связанного в комплексе с лактат-дегидрогеназой.



Рис. 12.13. Конформация гексокиназы значительно изменяется при связывании глюкозы (показано красным). Две доли фермента сближаются и окружают субстрат. (Печатается с любезного разрешения д-ра Thomas Steitz.)

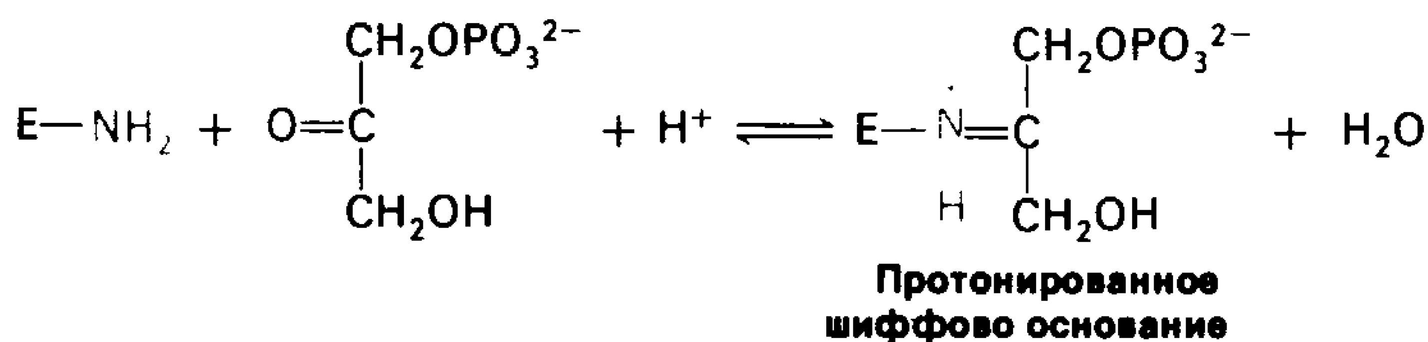
NAD^+-связывающие участки очень сходны с таковыми в лактат-дегидрогеназе и алкоголь-дегидрогеназе. *Представляется вероятным, что сходство участков связывания NAD^+ в этих четырех ферментах представляет собою пример фундаментального структурного мотива NAD^+-зависимых дегидрогеназ.*

12.12. Глюкоза индуцирует большие конформационные изменения в гексокиназе

Рентгенокристаллографическое исследование дрожжевой гексокиназы показывает, что связывание глюкозы приводит к большим конформационным изменениям фермента. Молекула гексокиназы состоит из двух долей, которые сближаются при связывании глюкозы (рис. 12.13). Глюкоза вызывает поворот одной доли относительно другой на 12°. В результате ось полипептида сдвигается на 8 Å. Щель между долями закрывается, и связанная глюкоза оказывается окруженной белком (кроме его 6-гидроксиметильной группы). Закрывание щели в гексокиназе служит ярким примером той роли, которую играет в механизме ферментативного действия *индуцированное соответствие* (разд. 6.8), впервые постулированное Кошландом (Koshland). Индуцированные глюкозой структурные изменения имеют важное значение, по-видимому, в двух отношениях. Во-первых, окружение глюкозы становится в значительно большей степени неполярным, что усиливает перенос фосфорильной группы от АТР. Во-вторых, обхватывание глюкозы гексокиназой создает неблагоприятные условия для участия H_2O в качестве субстрата реакции. Если бы гексокиназа имела жесткую структуру, молекула воды, заняв участок связывания —CH_2OH-группы глюкозы, действовала бы на α-фосфат АТР. Иными словами, «жесткая» киназа помимо киназной активности обладала бы также и активностью АТРазы. Эта нежелательная активность предотвращается благодаря тому, что ферментативная активность киназы проявляется лишь в том случае, если щель между долями фермента закрыта глюкозой. Мы видим здесь, как *гибкость фермента способствует его специфичности.* Интересно отметить, что в молекулах пируваткиназы, фосфоглицераткиназы и фосфофруктокиназы также имеются щели между долями, которые закрываются при связывании субстрата. *Индуцируемое субстратом закрывание щели,* рассмотренное здесь на примере гексокиназы, иллюстрирует наличие у всех киназ важного общего свойства.

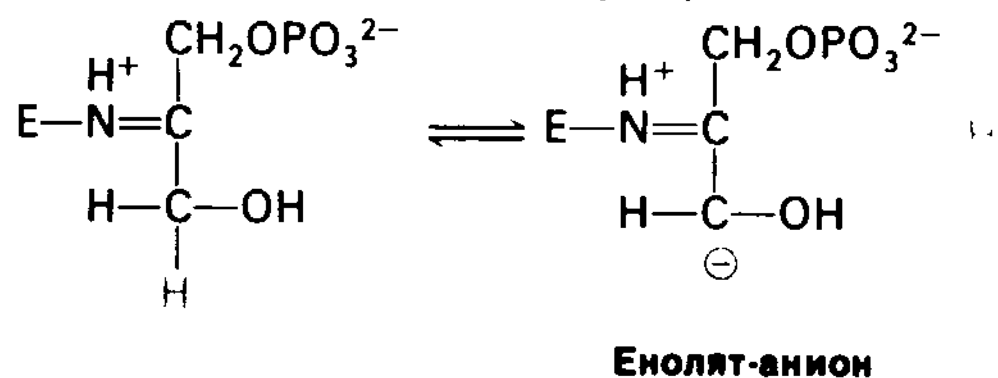
12.13. Альдолаза образует шиффово основание с дигидроксиацетонфосфатом

Обратимся теперь к альдолазе, которая катализирует конденсацию дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата

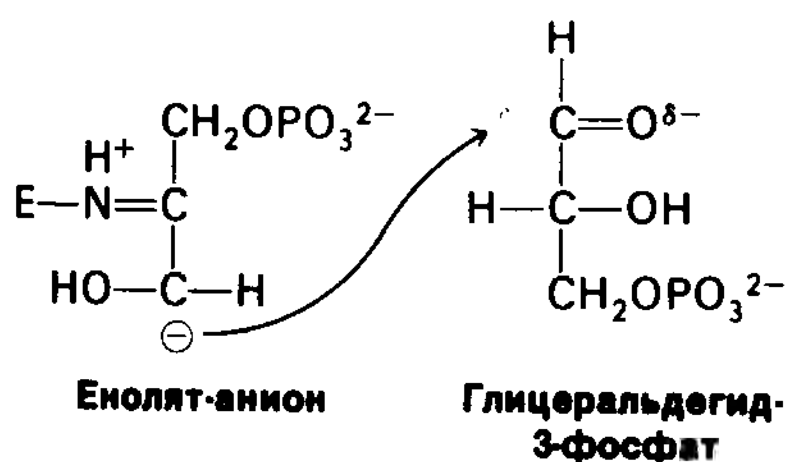


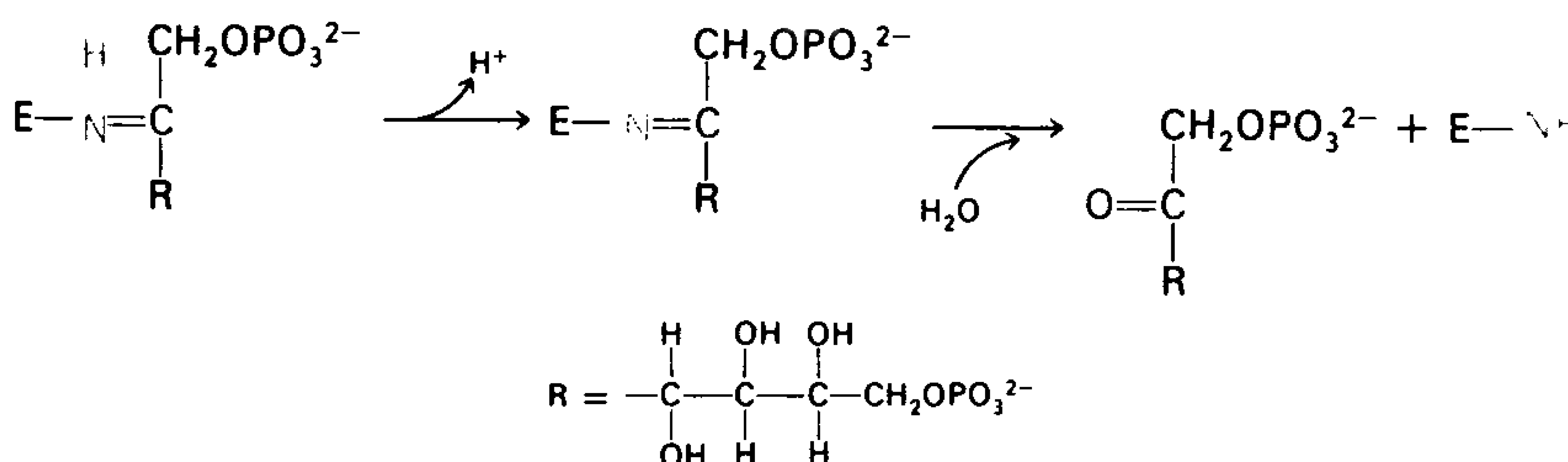
с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата. Сначала дигидроксиацетонфосфат образует протонированное шиффово основание со специфическим лизиновым остатком в активном центре альдолаз, присутствующих в тканях животных

Это протонированное шиффово основание играет в катализе решающую роль, поскольку оно способствует образованию енолят-аниона дигидроксиацетонфосфата.



Последующее присоединение глицеральдегид-3-фосфата к образующемуся в качестве промежуточного соединения енолят-аниону дает протонированное шиффово основание фруктозо-1,6-бисфосфата.



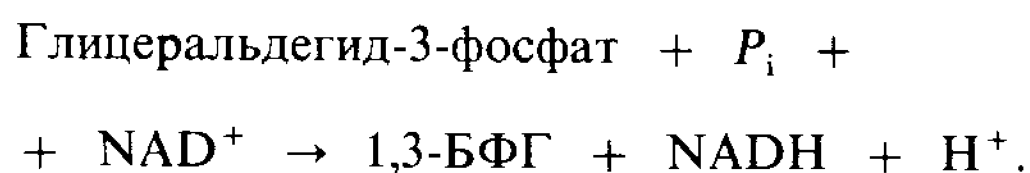


Это шиффово основание депротонируется и гидролизуется, образуя фруктозо-1,6-бисфосфат и регенерированный фермент.

Путь расщепления фруктозо-1,6-бисфосфата представляет собой простое обращение рассмотренного пути его образования.

12.14. Образование тиоэфира при окислении глицеральдегид-3-фосфата

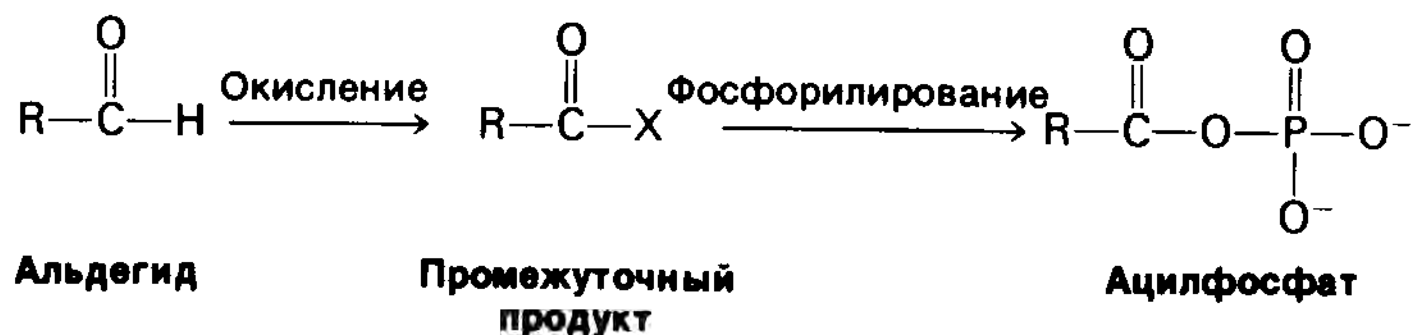
При действии глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы образуются различные виды фермент-субстратных промежуточных продуктов. Фермент катализирует окислительное фосфорилирование своего альдегидного субстрата.



Глицеральдегид-3-фосфат + P_i +

+ NAD^+ → 1,3-БФГ + NADH + H^+.

В процессе превращения альдегида в ацилфосфат сначала происходит окисление альдегидной группы

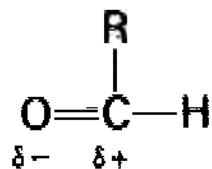


Это требует *удаления гидрид-иона* (: H^-), который представляет собою ядро атома водорода с двумя электронами. Отделение гидрид-иона от альдегида сопряжено с преодолением мощного барьера, обусловлен-

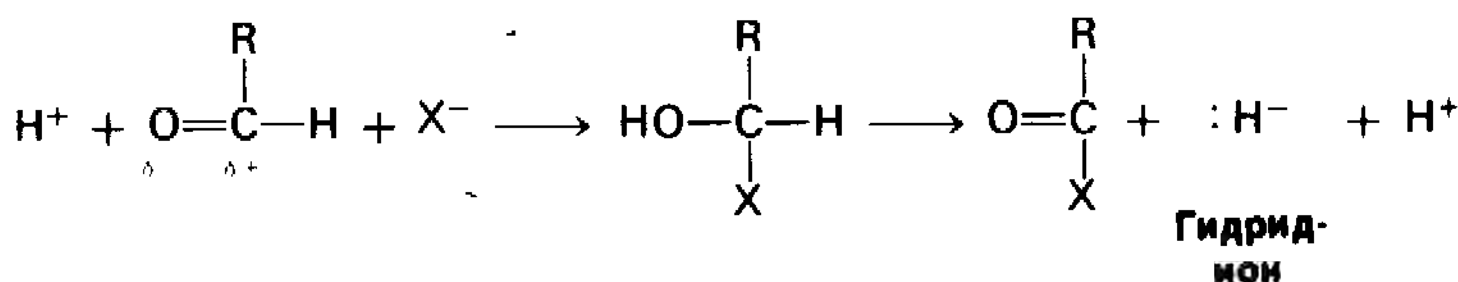


Рис. 12.14. Микрофотография кристаллов альдолазы. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Eisenberg.)

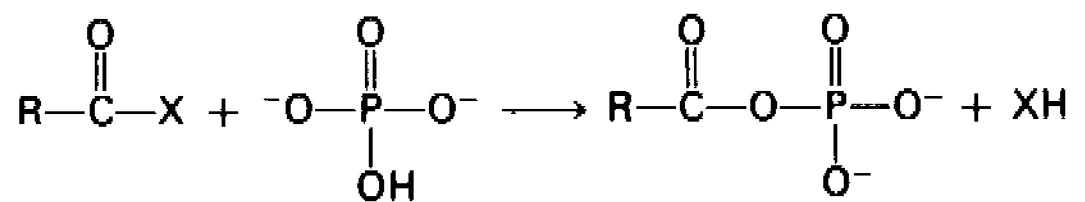
ного биполярным характером карбонильной группы. Углеродный атом карбонильной группы уже имеет частичный положительный заряд.



Удаление гидрид-иона облегчается уменьшением положительного заряда атома углерода. Это достигается *присоединением нуклеофильного агента*, обозначаемого как X^- в следующем уравнении:



Гидрид-ион легко отделяется от образовавшегося продукта, поскольку углеродный атом больше не несет высокого положительного заряда. Более того, некоторое количество свободной энергии окисления накапливается в ацильном промежуточном продукте. Присоединение к этому промежуточному продукту ортофосфата приводит к образованию ацилфосфата, имеющего высокий потенциал переноса группы. Описанная последовательность реакций названа *фосфорилированием на субстратном уровне*, или *субстратным фосфорилированием.*



Теперь посмотрим, каким образом глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа катализирует эти реакции (рис. 12.15). *Нуклеофильный агент X^- - это сульфгидрильная группа цистеинового остатка в активном центре фермента.* Альдегидный субстрат реагирует с ионизированной формой указанной сульфгидрильной группы с образованием полутиоацеталя. Следующий этап — перенос гидрид-иона. *Акцептором для гидрид-иона служит молекула NAD^+, которая прочно связана с ферментом.* Продуктами реакции являются восстановленный кофермент NADH и тиоэфир. *Этот тиоэфир представляет собою богатый энергией промежуточный продукт*, соответствующий упомянутому ранее ацильному промежуточному продукту. NADH отделяется от фермента, и с активным центром вновь связывается NAD^+. Далее ортофосфат воздействует на тиоэфир с образованием 1,3-бисфосфоглицерата, богатого энергией фосфата. Образование 1,3-бисфосфоглицерата из 3-фосфоглицеральдегида имеет крайне важное значение, поскольку термодинамически невыгодная реакция, образование ацилфосфата из карбоксилата, стимулируется при этом термодинамически выгодной реакцией, окислением альдегида.



Эти две реакции *сопряжены тиоэфирным промежуточным продуктом*, который накапливает большую часть энергии, освобождающейся при реакции окисления. Мы сталкиваемся здесь с *использованием ковалентно связанного с ферментом промежуточного продукта в качестве механизма сопряжения энергии.*

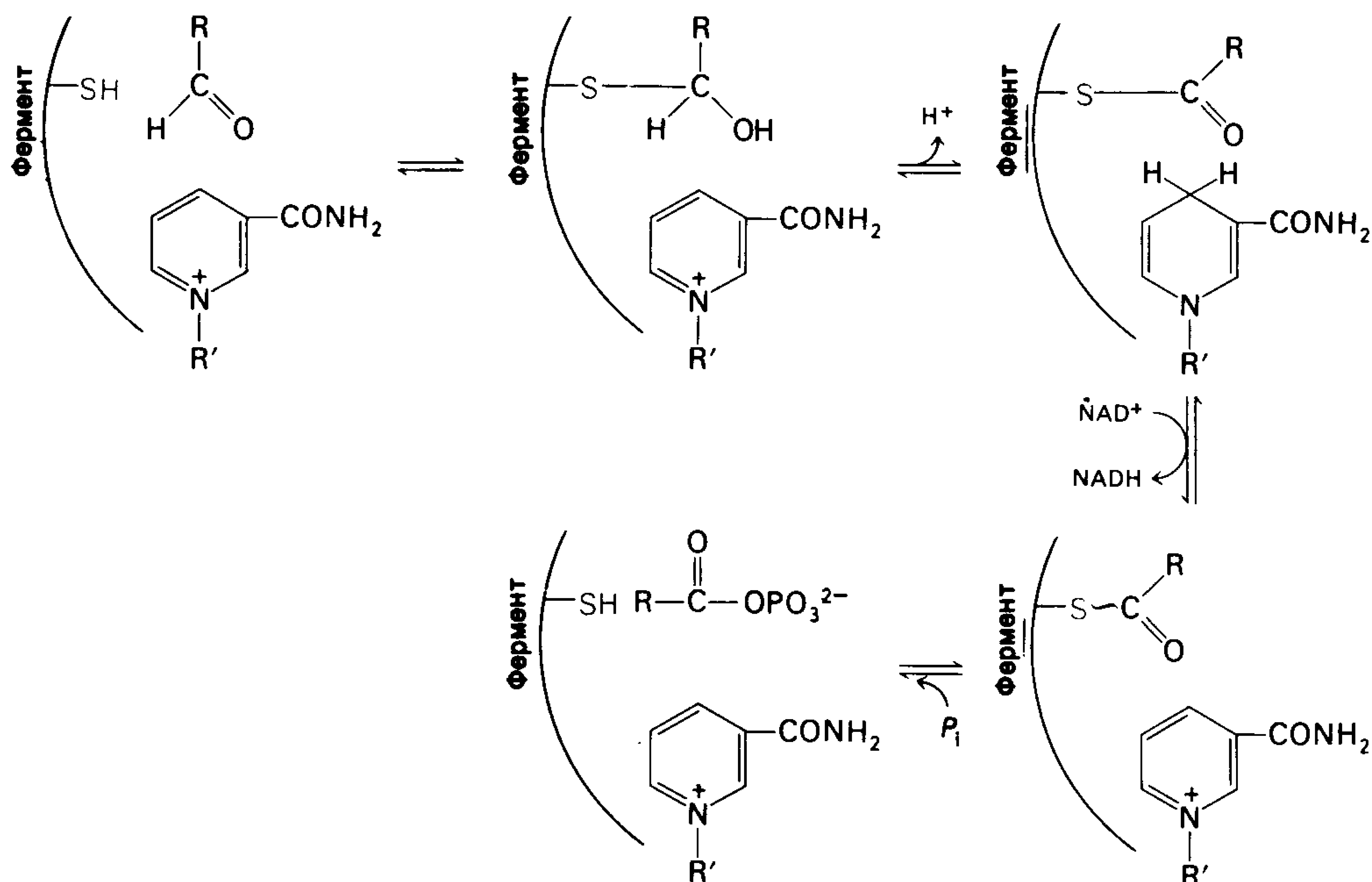
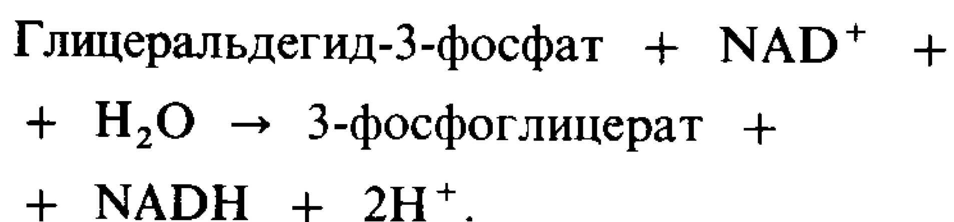


Рис. 12.15. Механизм каталитического действия глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназы.

12.15. Арсенат, аналог фосфата, действует как разобщитель

Арсенат (AsO_4^{3-}) очень сходен с P_i по структуре и реакционной способности. В реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой, арсенат может заменять фосфат по воздействию на богатый энергией тиоэфирный промежуточный продукт. Образующийся в результате этой реакции 1-арсено-3-фосфоглицерат в противоположность 1,3-бисфосфоглицерату неустойчив. 1-арсено-3-фосфоглицерат и другие ациларсенаты очень быстро и самопроизвольно гидролизуются. Поэтому суммарная реакция, протекающая в присутствии арсената, выглядит следующим образом:



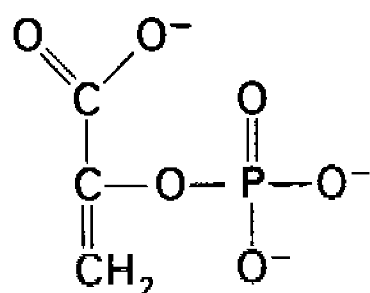
Глицеральдегид-3-фосфат + NAD^+ + H_2O → 3-фосфоглицерат + NADH + $2H^+$.

Обратите внимание, что гликолиз идет в присутствии арсената, но он не сопровождается образованием АТР, происходящим в норме в процессе превращения 1,3-бисфосфоглицерата в 3-фосфоглицерат. Таким образом, *арсенат разобщает окисление и фосфорилирование путем образования высоколабильного ациларсената.* Вероятная причина предпочтения фосфора арсенату в процессе эволюции биологических молекул состоит в большей кинетической стабильности фосфорных высокоэнергетических соединений.

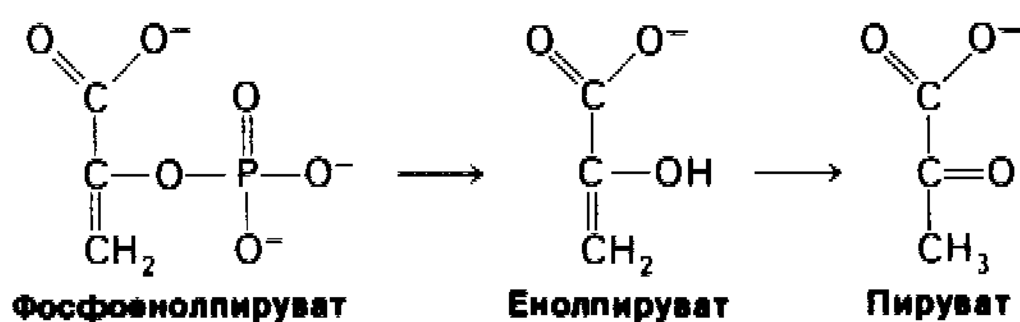


12.16. Енолфосфат имеет высокий потенциал переноса группы

Поскольку 1,3-БФГ является *ацилфосфатом*, он обладает высоким потенциалом переноса группы. На более поздних этапах гликолиза образуются различные высокоэнергетические соединения фосфата. Фосфоенолпируват, *енолфосфат*, образуется в результате дегидратации 2-фосфоглицерата. $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза фосфатного эфира обычного спирта составляет −3 ккал/



моль, тогда как для фосфоенолпирувата эта величина равна – 14,8 ккал/моль. Почему фосфоенолпируват имеет такой высокий потенциал переноса фосфатной группы? Ответ заключается в том, что реакция не останавливается на переносе фосфорильной группы при образовании енола. Енол претерпевает превращение в кетон, а именно в пируват.

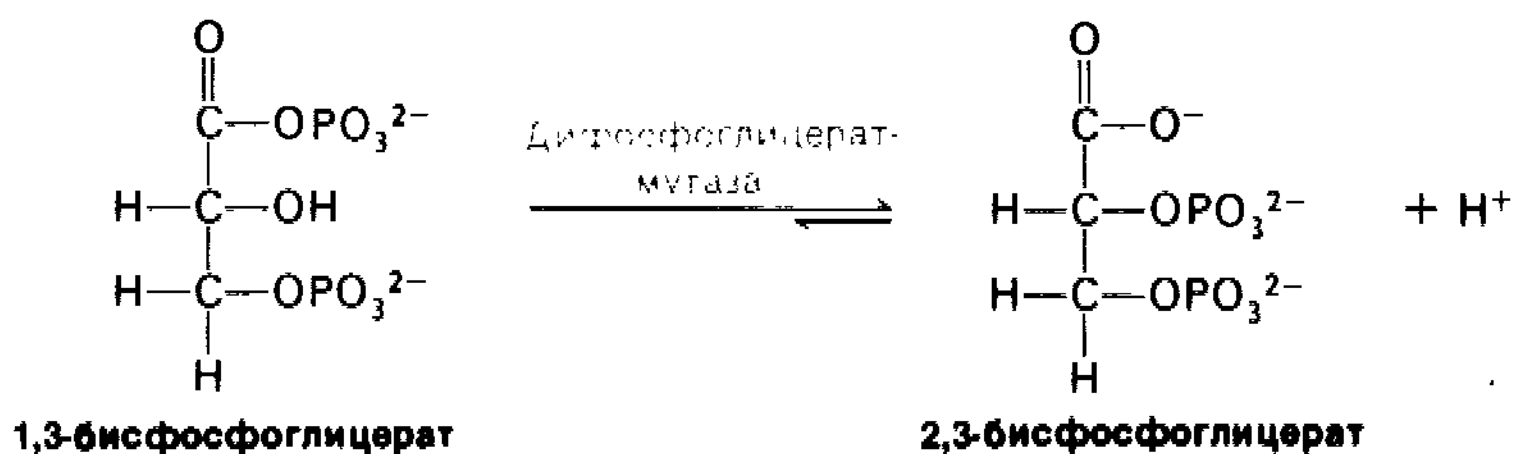


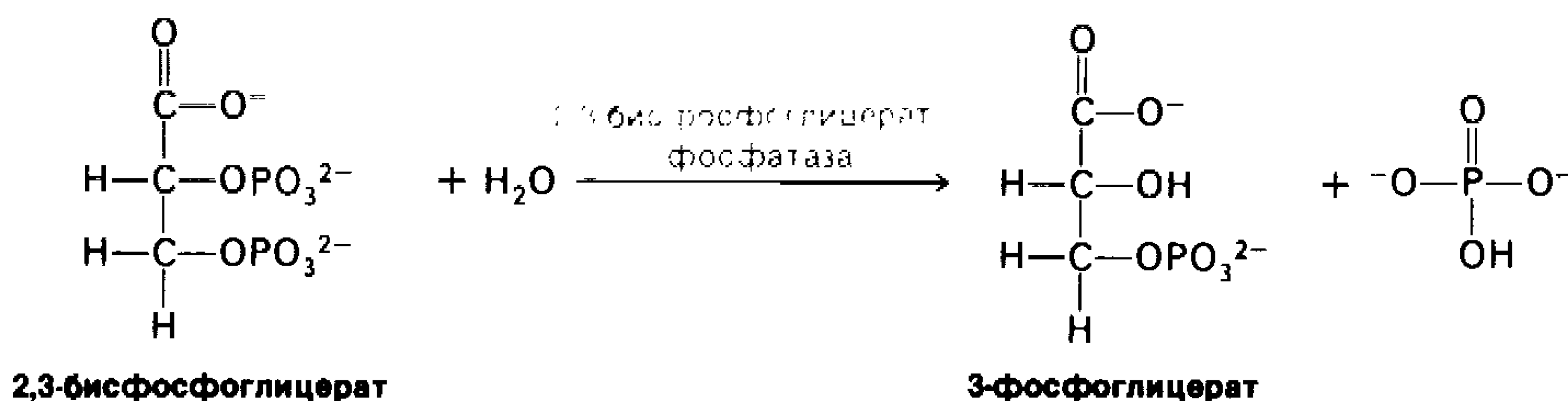
12.17. Метаболизм 2,3-бисфосфоглицерата, регулятора транспорта кислорода

Напомним, что 2,3-бисфосфоглицерат (2,3-БФГ) служит регулятором транспорта кислорода в эритроцитах. Он снижает сродство гемоглобина к кислороду, стабилизируя дезоксигенированную форму гемоглобина (гл. 4). Эритроциты характеризуются высокой концентрацией 2,3-БФГ (обычно равной 4 мМ), что отличает их от других клеток, содержащих лишь следовые количества этого соединения. 2,3-БФГ играет общую роль в качестве кофактора при превращении 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат, осуществляемом фотоглицератмутазой.

Синтез и расщепление 2,3-БФГ идут в обход гликолитического пути (рис. 12.16) *Под действием бисфосфоглицератмутазы* (дифосфоглицератмутазы) 1,3-БФГ превращается в 2,3-БФГ.

2,3-БФГ гидролизуется *2,3-бисфосфоглицерат-фосфатазой* с образованием 3-фос-





$\Delta G^{0\prime}$ превращения енол → кетон очень велико, составляя примерно – 10 ккал/моль. Сравним эту величину с величиной $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза фосфоенолпирувата в енолпируват, равной примерно – 3 ккал/моль. Таким образом, *присущий фосфоенолпирувату высокий потенциал переноса фосфатной группы возникает из большой движущей силы последующего превращения енол → → кетон.*

фоглицерата. Фосфатаза – фермент, катализирующий гидролиз фосфатного эфира.

Интересен механизм этой мутазной реакции. *3-фосфоглицерат* является ее обязательным участником, хотя в итоговой стехиометрии реакции он не фигурирует. Мутаза одновременно связывает 1,3-бисфосфоглицерат и 3-фосфоглицерат. В этом тройном комплексе происходит перенос фосфорильной группы от С-1 1,3-бисфосфоглицерата на С-2 3-фосфоглицерата (рис. 12.17).

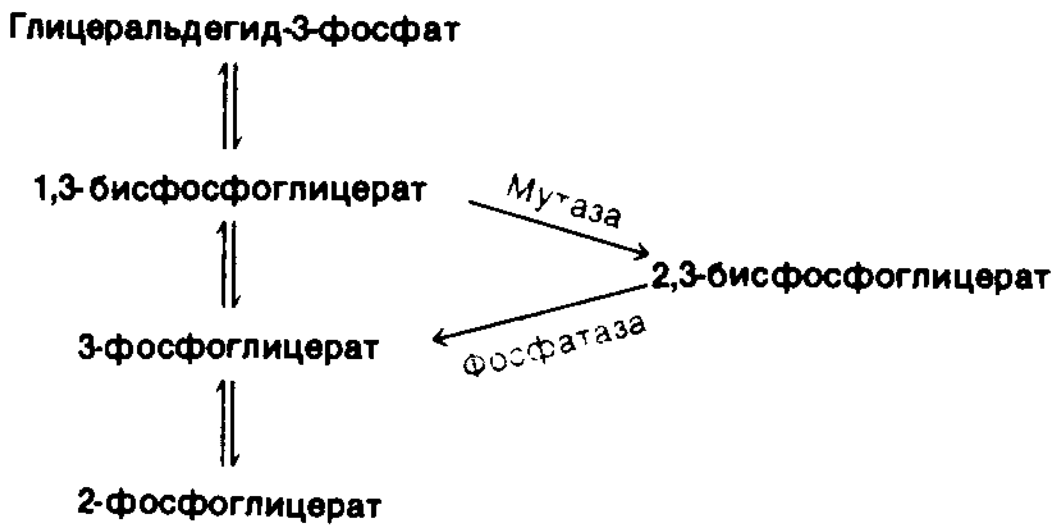


Рис. 12.16. Путь синтеза и распада 2,3-бисфосфоглицерата.

Таблица 12.3. **Обычные концентрации промежуточных продуктов гликолиза в эритроцитах. (Minakami S., Yoshikawa H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 345, 1965.)**

Промежуточный продукт	Концентрация, мкМ
Глюкоза	5000
Глюкозо-6-фосфат	83
Фруктозо-6-фосфат	14
Фруктозо-1,6-бисфосфат	31
Дигидроксиацетонфосфат	138
Глицеральдегид-3-фосфат	19
1,3-бисфосфоглицерат	1
2,3-бисфосфоглицерат	4000
3-фосфоглицерат	118
2-фосфоглицерат	30
Фосфоенолпируват	23
Пируват	51
Лактат	2900
ATP	1850
ADP	138
P_i	1000

В данной мутазной реакции 2,3-БФГ выступает как мощный конкурентный ингибитор в отношении 1,3-БФГ. Таким образом, скорость синтеза 2,3-БФГ отчасти зависит от его собственной концентрации. Другим регуляторным фактором является концентрация 1,3-БФГ, поскольку фермент не всегда насыщен этим соединением. В отличие от этого содержание 3-фосфоглицерата в эритроцитах почти находится на том уровне, который необходим для насыщения мутазы. Таким образом, *скорость синтеза 2,3-БФГ регулируется концентрацией несвязанных 1,3-БФГ и 2,3-БФГ.*

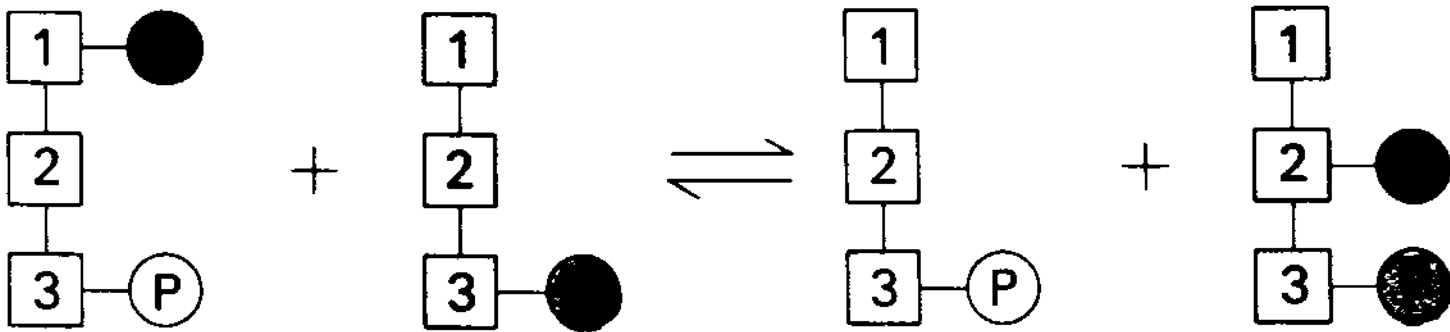


Рис. 12.17. Схематическое изображение участия 3-фосфоглицерата в превращении 1,3-бисфосфоглицерата в 2,3-бисфосфоглицерат.

12.18. Нарушение гликолиза в эритроцитах приводит к изменению транспорта кислорода

Гликолиз в эритроцитах и транспорт кислорода связаны между собой участием в обоих процессах 2,3-бисфосфоглицерата. А это означает, что нарушения гликолиза могут оказывать влияние на транспорт кислорода. Действительно, у некоторых больных с наследственными нарушениями гликолиза в эритроцитах диссоциационные кривые кислорода изменены (рис. 12.18). При *недостаточности гексокиназы* концентрация промежуточных продуктов глико-

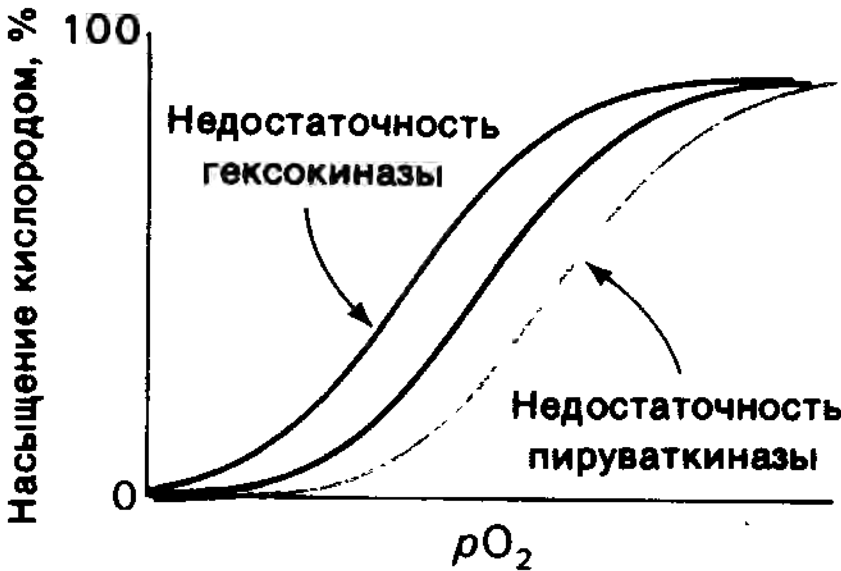


Рис. 12.18. Кривые диссоциации кислорода для нормальных эритроцитов (черная линия), эритроцитов больного с недостаточностью гексокиназы (красная линия) и эритроцитов больного с недостаточностью пируваткиназы (синяя линия).

лиза находится на низком уровне из-за нарушения первого этапа процесса – фосфорилирования глюкозы. Для эритроцитов таких больных характерна пониженная концентрация 2,3-БФГ, а следовательно, гемоглобин у них обладает *ненормально высоким сродством к кислороду*. Прямо противоположные изменения имеют место в случае *недостаточности пируваткиназы*. Концентрация промежуточных продуктов гликолиза оказывается ненормально высокой, что объясняется блокированием конечного этапа процесса. Соответственно содержание 2,3-БФГ вдвое превышает норму, что обусловливает *низкое сродство гемоглобина к кислороду*. Отклонения от нормы диссоциационных кривых кислорода при недостаточности гексокиназы и пируваткиназы казались необъяснимыми, пока не было установлено, что 2,3-БФГ служит регулятором транспорта кислорода.

Заключение

Гликолиз – это совокупность реакций превращения глюкозы в пируват. У аэробных организмов гликолиз служит как бы прелюдией к циклу трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов, в ходе которых запасается бóльшая часть свободной энергии, содержащейся в глюкозе. Десять реакций гликолиза протекают в цитозоле. На первой стадии глюкоза превращается во фруктозо-1,6-бисфосфат путем фосфорилирования, изомеризации и второй реакции фосфорилирования. В этих реакциях, играющих роль подготовительного этапа для генерирования ATP, на каждую молекулу глюкозы расходуются две молекулы ATP. На второй стадии фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется альдолазой на дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат, которые легко подвергаются взаимопревращению. Глицеральдегид-3-фосфат затем окисляется и фосфорилируется с образованием 1,3-БФГ – ацилфосфата, обладающего высоким потенциалом переноса фосфатной группы. Образование 3-фосфоглицерата связано с генерированием одной молекулы ATP. На последней стадии гликолиза путем перемещения фосфорильной группы и дегидратации образуется фосфоенолпируват, второй промежуточный продукт с высоким потенциалом переноса фосфатной группы. Превращение фосфоенолпирувата в пируват сопровождается генерированием еще одной молекулы ATP. Таким образом, при образовании двух молекул пирувата из одной молекулы глюкозы накапливаются две молекулы ATP.

Акцептором электронов при окислении глицеральдегид-3-фосфата служит NAD^+. Следовательно, чтобы гликолиз мог продолжаться, NAD^+ по мере потребления должен регенерироваться. У аэробных организмов NADH, образующийся в ходе гликолиза, передает свои электроны на O_2 по цепи переноса электронов, что приводит в результате к регенерированию NAD^+. В анаэробных условиях регенерирование NAD^+ происходит при восстановлении пирувата в лактат. У некоторых микроорганизмов в норме имеет место регенерирование NAD^+ в ходе синтеза лактата или этанола из пирувата. Эти два процесса называются брожением.

Гликолитический путь играет двоякую роль: он приводит к генерированию ATP в результате распада глюкозы и он же поставляет строительные блоки для синтеза клеточных компонентов. Регуляция скорости превращения глюкозы в пируват направлена на удовлетворение этих двух основных потребностей клетки. Реакции гликолитического пути в физиологических условиях легко обратимы, кроме реакций, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой. Фосфофруктокиназа, наиболее важный регуляторный элемент в процессе гликолиза, ингибируется высокими концентрациями ATP и цитрата и активируется AMP. Поэтому фосфофруктокиназа активна при возникновении потребности в энергии или в строительных блоках. Гексокиназа ингибируется глюкозо-6-фосфатом, который накапливается, когда фосфофруктокиназа неактивна. Пируваткиназа, другой регуляторный фермент, аллостерически ингибируется ATP, и, следовательно, превращение фосфоенолпирувата в пируват блокируется при высоком энергетическом заряде клетки.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Книги и обзоры по общим вопросам

Davison E. A., 1967. Carbohydrate Chemistry, Holt, Rinehart and Winston.

Pigman W. W., Horton D. (eds.), 1972. The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry, Academic Press.

Dickens F., Randle P. J., Whelan W. J., 1968. Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, vols 1 and 2, Academic Press.

Гликолитические ферменты

Boyer P. D. (ed.), 1972. The Enzymes (3rd ed.), Academic Press. (Тома с 5-го по 9-й содержат обзоры автора по каждому из ферментов гликолиза. Алкогольдегидрогеназа и лактат-дегидрогеназа рассматриваются в томе 10.)

Blake C. C. F., 1975. X-ray studies of glycolytic enzymes, Essays Biochem., **11**, 37–79.

Bennett W. S., Jr., Steitz T. A., 1978. Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 4848–4852.

Knowles J. R., Albery W. J., 1977. Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase, Acc. Chem. Res., **10**, 105–111.

Biesecker G., Harris J. L., Thierry J. C., Walker J. E., Wonacott A. J., 1977. Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*, Nature, **266**, 328–333.

Anderson C. M., Zucker F. H., Steitz T. A., 1979. Space-filling models of kinase clefts and conformation changes, Science, **204**, 375–380. (Хорошо иллюстрированная и четкая работа, показывающая, что киназы имеют обычно глубокую щель, которая заполняется связывающимся субстратом.)

Регуляция гликолиза

Newsholme E. A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism, Wiley. (В гл. 3 и 6 дается прекрасный анализ регуляции углеводного обмена.)

Ottaway J. H., Mowbray J., 1977. The role of compartmentation in the control of glycolysis, Curr. Top. Cell Regul., **12**, 108–195.

Clark M. G., Lardy H. A., 1975. Regulation of intermediary carbohydrate metabolism, Intern. Rev. Sci. (Biochem.), **5**, 223–266.

Молекулярная эволюция

Rossman M. G., Liljas A., Bränden C.-L., Banaszak L. J., 1975. Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 11, pp. 61–102.

Levine M., Muirhead H., Stammers D. K., Stuart D. I., 1978. Structure of pyruvate kinase and similarities with other enzymes: possible implications for protein taxonomy and evolution, Nature, **271**, 626–630.

2,3-бисфосфоглицерат

Benesch R. E., Benesch R., 1970. The reaction between diphosphoglycerate and hemoglobin, Fed. Proc., **29**, 1101–1104.

Rose Z. B., 1970. Enzymes controlling 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes, Fed. Proc., **29**, 1105–1111.

Delivoria-Papadopoulos M., Oski F. A., Gottlieb A. J., 1969. Oxygen-hemoglobin dissociation curves: effect of inherited enzyme defects of the red cell, Science, **165**, 601–602.

Исторические аспекты

Kalckar H. M. (ed.), 1969. Biological Phosphorylations: Development of Concepts, Prentice-Hall. (Содержит многие классические работы по гликолизу.)

Fruton J. S., 1972. Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology, Wiley-Interscience.

(Включает досконально документированный отчет об истории изучения природы брожения и о том, как изучение брожения привело к зарождению химии ферментов.)

ПРИЛОЖЕНИЕ

Стереохимические соотношения некоторых сахаров

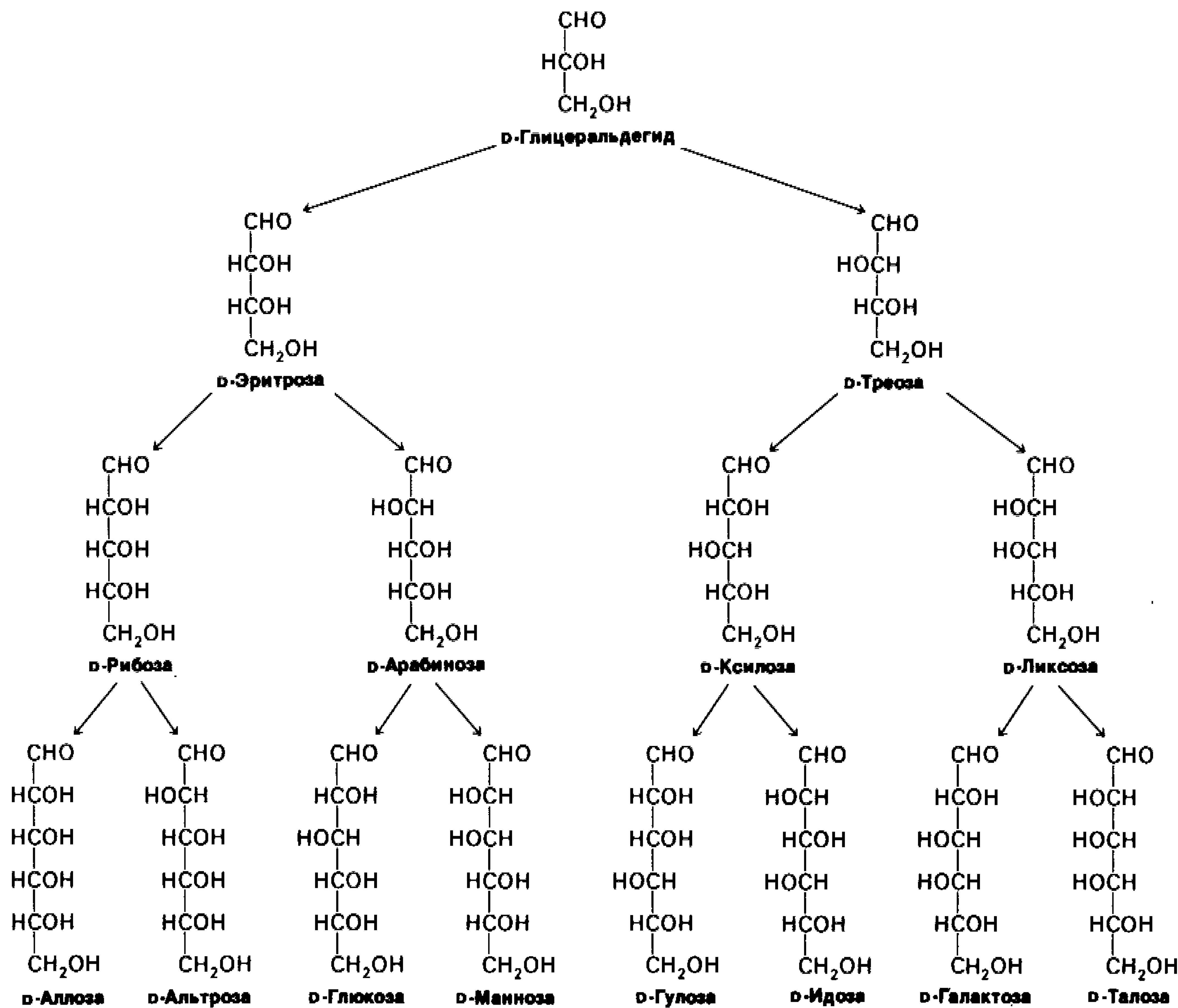


Рис. 12.19. Стереохимические соотношения D-альдоз, содержащих три, четыре, пять и шесть атомов углерода.

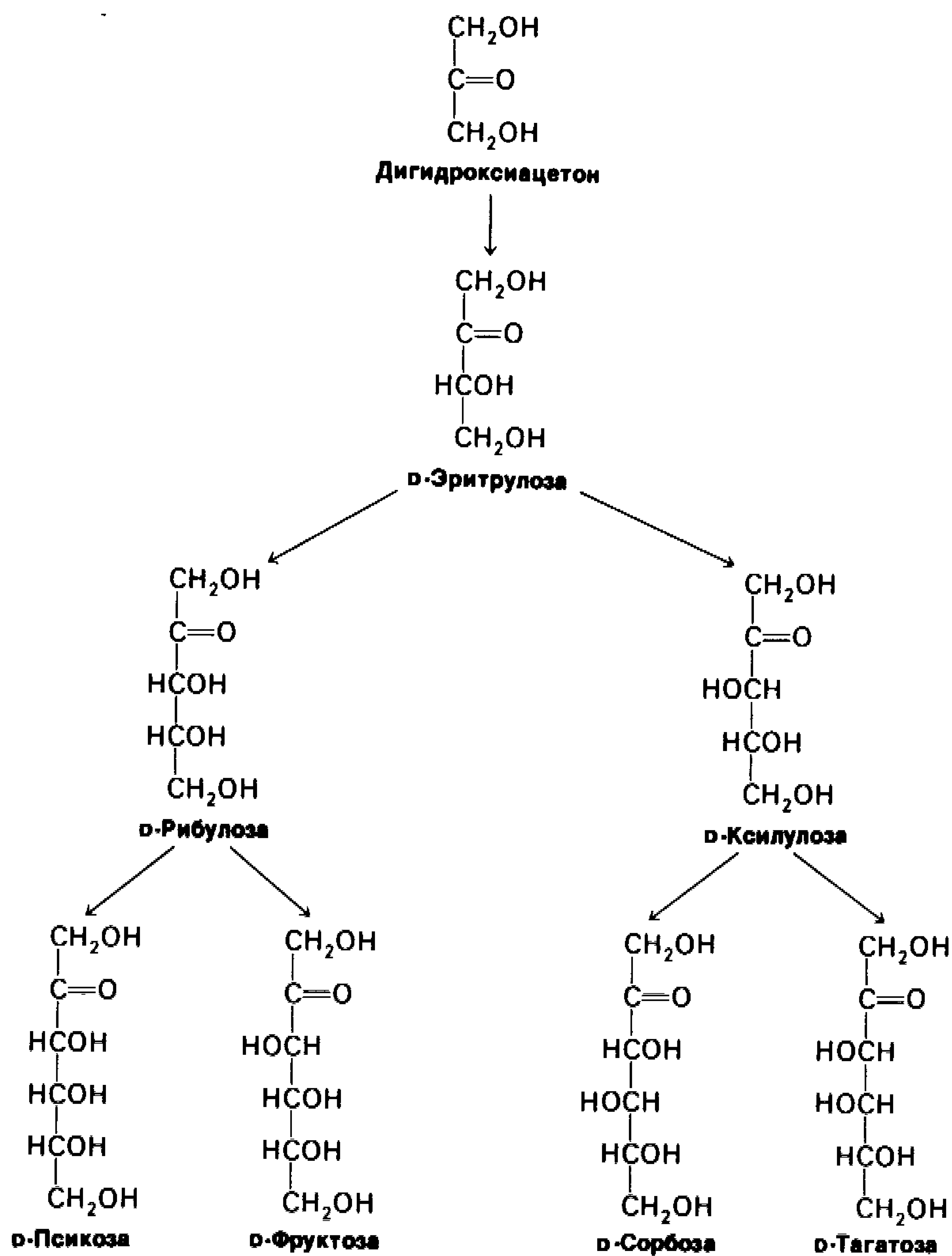


Рис. 12.20. Стереохимические соотношения D-кетоз, содержащих три, четыре, пять и шесть атомов углерода.

Вопросы и задачи

1. Углеводы, которые различаются только по конфигурации при карбонильных углеродных атомах, являются *аномерами*. *Эпимеры* различаются по конфигурации при специфических углеродных атомах, отличных от карбонильных. Укажите, какие из нижеприводимых пар сахаров представляют собою аномеры, эпимеры или пару альдоза–кетоза.

а) D-глицеральдегид и дигидроксиацетон.
б) D-глюкоза и D-манноза.
в) D-глюкоза и D-фруктоза.
г) α-D-глюкоза и β-D-глюкоза.
д) D-рибоза и D-рибулоза.
е) D-галактоза и D-глюкоза.

2. Глюкозу, меченную ^{14}C при С-1, инкубируют с ферментами гликолиза и необходимыми кофакторами. Каково распределение ^{14}C в образующемся пирувате? (Допустим, что взаимопревращение глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата происходит очень быстро по сравнению с последующей стадией.)

3. Напишите суммарное уравнение для превращения глюкозы в лактат.

а) Рассчитайте изменение стандартной свободной энергии этой реакции, используя данные табл. 12.2 (разд. 12.8) и учитывая, что для реакции Пируват + NADH + + H^+ $\rightleftharpoons$ Лактат + NAD^+ $\Delta G^{0\prime}$ равно − 6 ккал.

б) Каково изменение свободной энергии ($\Delta G'$, а не $\Delta G^{0\prime}$) этой реакции при следующих концентрациях реагирующих веществ: глюкоза – 5 мМ; лактат – 0,05 мМ; ATP – 2 мМ; ADP – 0,2 мМ; P_i – 1 мМ?

4. Каково равновесное отношение фосфоенолпирувата к пирувату при стандартных условиях, когда [ATP]/[ADP] = 10?

5. Каковы равновесные концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата, дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата при инкубации фруктозо-1,6-бисфосфата (1 мМ) с альдолазой в стандартных условиях?

6. 3-фосфоглицерат, равномерно меченный ^{14}C, инкубируют с 1,3-БФГ, меченным ^{32}P при С-1. Каково распределение радиоактивного изотопа в 2,3-БФГ, образующемся при добавлении бисфосфоглицератмутазы?

7. Ксилоза имеет такую же структуру, как глюкоза, с той лишь разницей, что при С-5 у нее вместо гидроксиметильной группы находится атом водорода. Скорость гидролиза ATP гексокиназой значительно повышается при добавлении ксилозы. Почему?

8. Активный центр фосфоглицерат-мутазы содержит два гистидиновых остатка, параллельных друг другу и отстоящих друг от друга на 4 Å. Предложите вероятный каталитический механизм.

Дополнительные вопросы см.:

Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., L. E. Hood. Biochemistry: A Problems Approach (Benjamin, 1974), ch. 9.

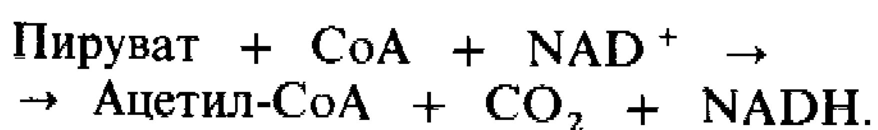
ГЛАВА 13

Цикл трикарбоновых кислот

В предыдущей главе мы рассмотрели гликолитический путь, в ходе которого происходит превращение глюкозы в пируват. В аэробных условиях следующим этапом генерирования энергии из глюкозы является окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-CoA. Этот активированный ацетильный компонент далее полностью окисляется до CO_2 в *цикле трикарбоновых кислот*, последовательности реакций, известных также как *цикл лимонной кислоты*, или *цикл Кребса*. Цикл трикарбоновых кислот представляет собою *конечный общий путь окисления топливных молекул* – аминокислот, жирных кислот и углеводов. Большинство топливных молекул вступают в этот цикл после превращения в ацетил-CoA. Цикл трикарбоновых кислот выполняет еще одну функцию – поставляет промежуточные продукты для процессов биосинтеза. Реакции цикла трикарбоновых кислот происходят в митохондриях в противоположность реакциям гликолиза, которые протекают в цитозоле.

13.1. Образование ацетилкофермента А из пирувата

Окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-CoA, протекающее в митохондриальном матриксе, служит связующим звеном между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот:



Пируват + CoA + NAD^+ →
→ Ацетил-CoA + CO_2 + NADH.

Это необратимое включение продукта гликолиза в цикл трикарбоновых кислот катализируется *пируват-дегидрогеназным комплексом*, представляющим собою очень большой мультиферментный комплекс – высокоинтегрированную систему трех видов ферментов, которые детально рассматриваются в разд. 13.11.

13.2. Общая характеристика цикла трикарбоновых кислот

Общая схема цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) приведена на рис. 13.3. Четырехуглеродное соединение (оксалоацетат) конденсируется с двухуглеродным ацетильным компонентом с образованием шестиуглеродной трикарбоновой кислоты (цитрата). Далее изомер цитрата подвергается окислительному декарбоксилированию. Образующееся при этом пятиуглеродное соединение (α-оксоглутарат) в результате окислительного декарбоксилирования превращается в четырехуглеродное соединение (сукцинат). Дальнейшие превращения сукцината приводят к регенерированию оксалоацетата. Два атома углерода вклю-

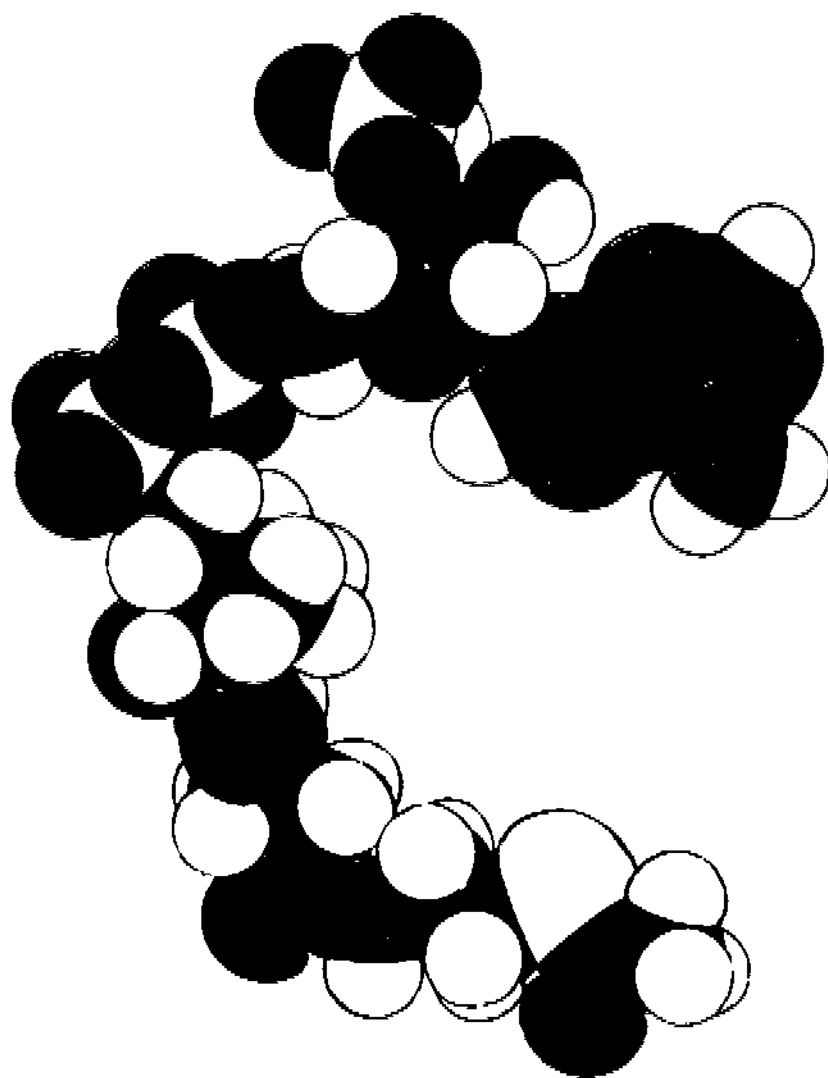
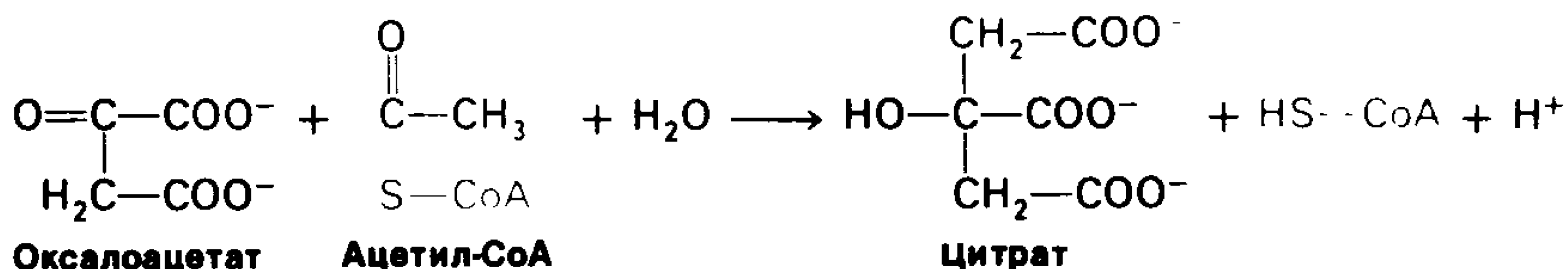


Рис. 13.1. Модель ацетил-CoA.



чаются в цикл в виде ацетильного компонента, а два атома углерода покидают цикл в виде двух молекул CO_2. Поскольку ацетильная группа восстановлена в большей степени, чем CO_2, то в цикле трикарбоновых кислот должны иметь место окислительно-восстановительные реакции. Действительно, насчитываются четыре такие реакции. Три гидрид-иона (т.е. шесть электронов) переносятся на три молекулы NAD^+, а одна пара атомов водорода (два электрона) переносится на молекулу флавинадениндинуклеотида (FAD). При окислении этих переносчиков электронов за счет O_2 в цепи переноса электронов образуется одиннадцать молекул аденозинтрифосфата (АТР). Кроме того, одна высокоэнергетическая фосфатная связь генерируется при каждом обороте самого цикла трикарбоновых кислот.

13.3. Оксалоацетат конденсируется с ацетил-коферментом А с образованием цитрата

Цикл начинается с конденсации четырехуглеродного компонента, оксалоацетата, и двухуглеродного компонента, ацетильной группы ацетил-СоА. Оксалоацетат реагирует с ацетил-СоА и H_2O, давая цитрат и СоА.

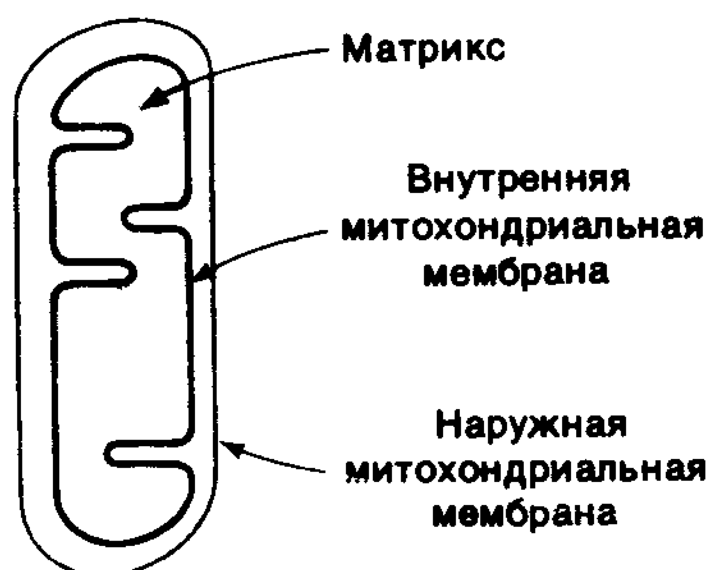
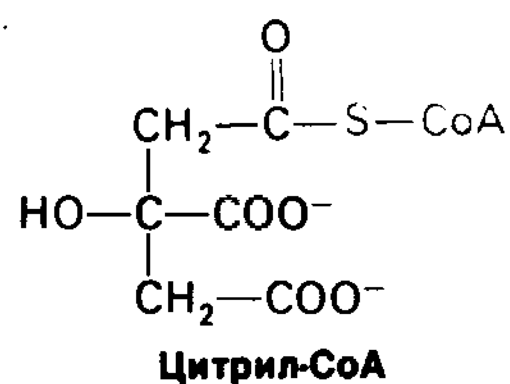


Рис. 13.2. Схематическое изображение митофондрии. Окислительное декарбоксилирование пирувата и последовательность реакций цикла трикарбоновых кислот происходят внутри митохондриального матрикса.

Эта реакция, представляющая собою альдольную конденсацию с последующим гидролизом, катализируется *цитрат-синтазой* (первоначально именовавшейся конденсирующим ферментом). Оксалоацетат вначале конденсируется с ацетил-СоА, образуя *цитрил-СоА*, который затем гидролизуется на цитрат и СоА. Гидролиз



цитрил-СоА приводит к тому, что суммарная реакция оказывается сдвинутой в направлении синтеза цитрата.

13.4. Цитрат изомеризуется в изоцитрат

Для того чтобы стало возможным окислительное декарбоксилирование шестиуглеродного соединения, цитрат должен быть изомеризован в изоцитрат. Изомеризация цитрата осуществляется путем *дегидратации* с последующей *гидратацией*. В результате происходит взаимоперемещение Н и ОН. Фермент, катализирующий обе реакции, назван *аконитазой*, поскольку предполагаемый промежуточный продукт представляет собою *цис-аконитат*.

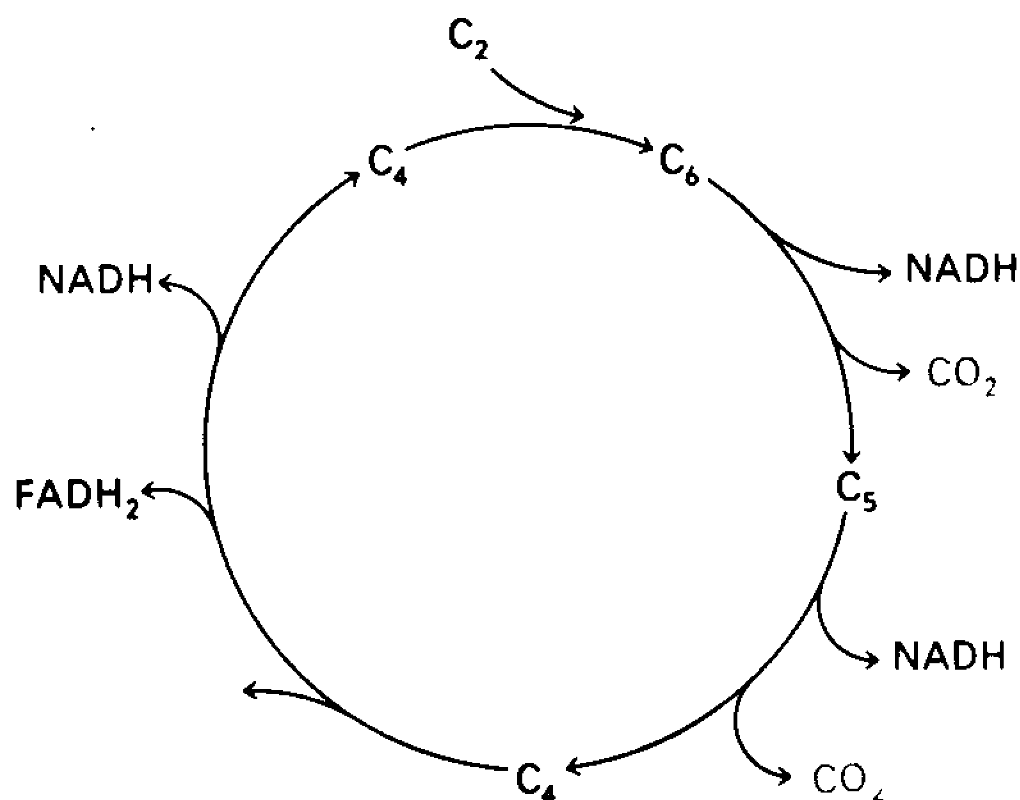
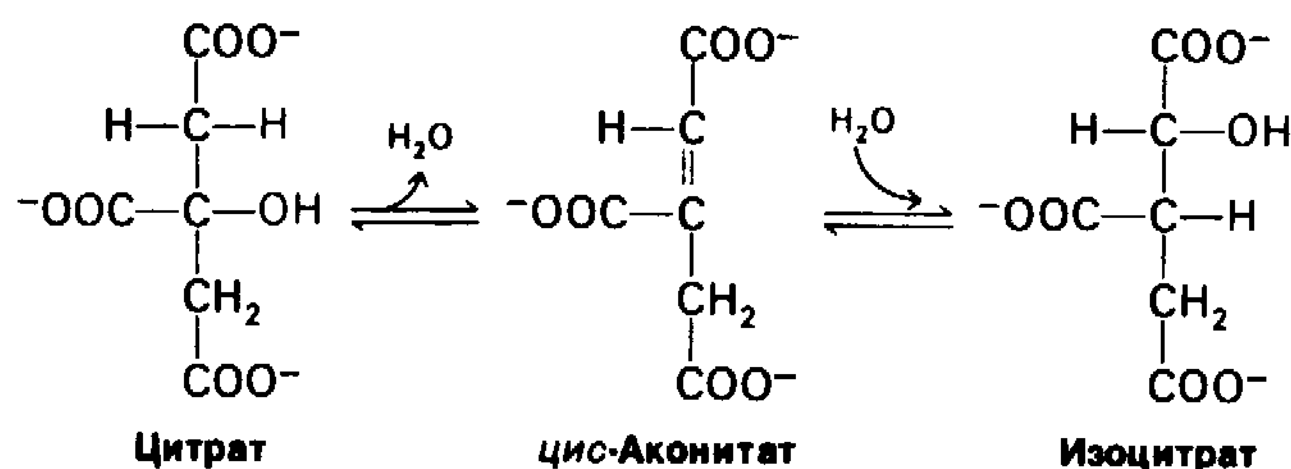
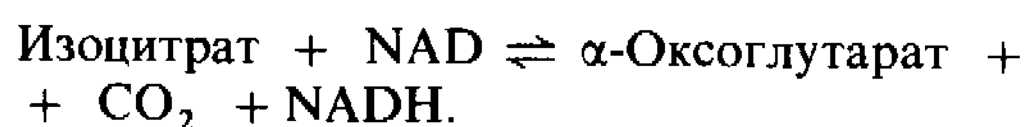


Рис. 13.3. Общая схема цикла трикарбоновых кислот.

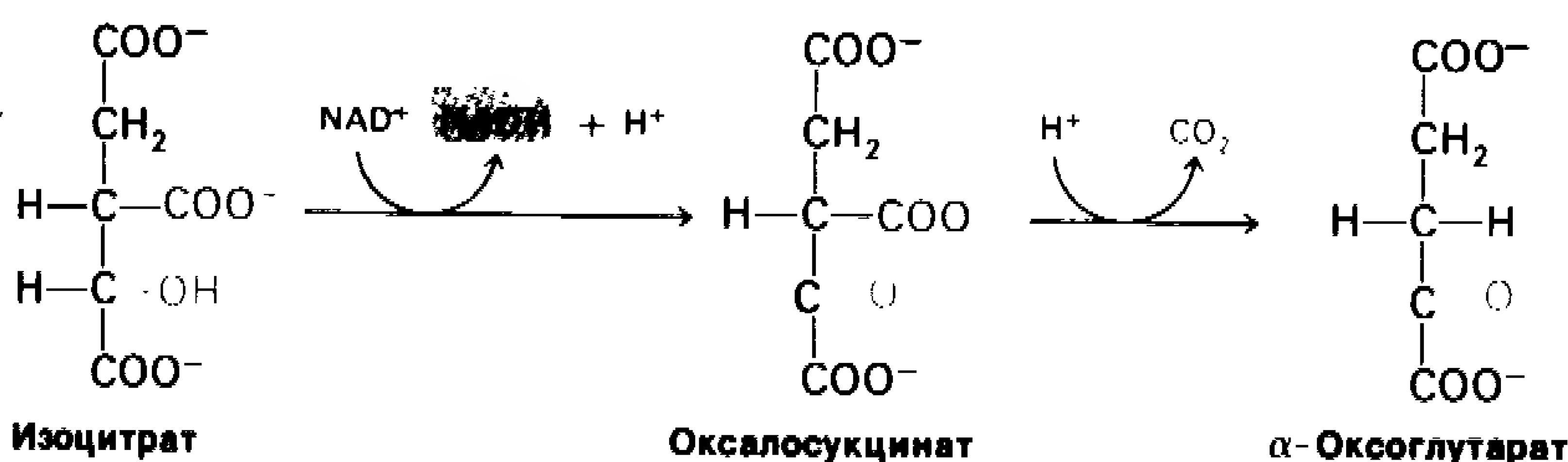


13.5. Изоцитрат окисляется и декарбоксилируется в альфа-оксоглутарат

Мы подошли теперь к первой из четырех окислительно-восстановительных реакций цикла трикарбоновых кислот. Окислительное декарбоксилирование изоцитрата катализируется *изоцитрат-дегидрогеназой*:


Изоцитрат + NAD ⇌ α-Оксоглутарат + + CO_2 + NADH.

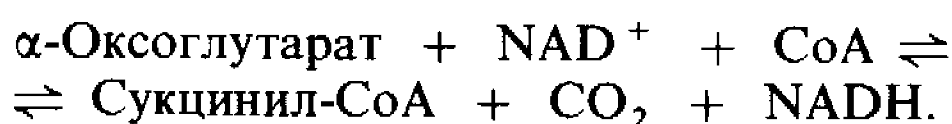
Промежуточный продукт этой реакции - оксалосукцинат, который быстро теряет CO_2 при связывании с ферментом и образовании α-оксоглутарата.



Скорость образования α-оксоглутарата играет важную роль в регуляции общей скорости цикла, что мы рассмотрим позднее (разд. 13.18). Следует также отметить, что имеются два вида изоцитрат-дегидрогеназ: одна зависимая от NAD^+, вторая - от никотинамиддинуклеотидфосфата ($NADP^+$). NAD^+-зависимый фермент, локализованный в митохондриях, имеет важное значение для цикла трикарбоновых кислот, $NADP^+$-зависимый фермент, присутствующий и в митохондриях, и в цитоплазме, играет иную метаболическую роль.

13.6. При окислительном декарбоксилировании альфа-оксоглутарата образуется сукцинил-СоА

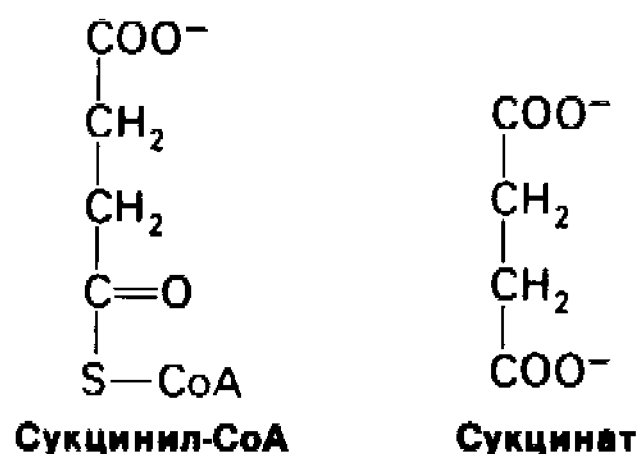
За превращением изоцитрата в α-оксоглутарат следует вторая реакция окислительного декарбоксилирования - образование сукцинил-СоА из α-оксоглутарата:


α-Оксоглутарат + NAD^+ + CoA ⇌ ⇌ Сукцинил-СоА + CO_2 + NADH.

Реакция катализируется *α-оксоглутарат-дегидрогеназным комплексом*, организованным ансамблем, состоящим из трех видов ферментов. *Механизм этой реакции очень сходен с механизмом превращения пирувата в ацетил-СоА.* В обоих случаях используются одни и те же кофакторы: NAD^+, CoA, тиаминпирофосфат, липоамид и FAD. Пируват-дегидрогеназный комплекс и α-оксоглутарат-дегидрогеназный комплекс имеют в действительности ряд общих структурных особенностей (разд. 13.11).

13.7. Генерирование высокоэнергетической фосфатной связи из сукцинилкофермента А

В сукцинильном тиоэфире CoA имеется связь, богатая энергией. $G^{0'}$ для гидролиза сукцинил-СоА около −8 ккал/моль, что



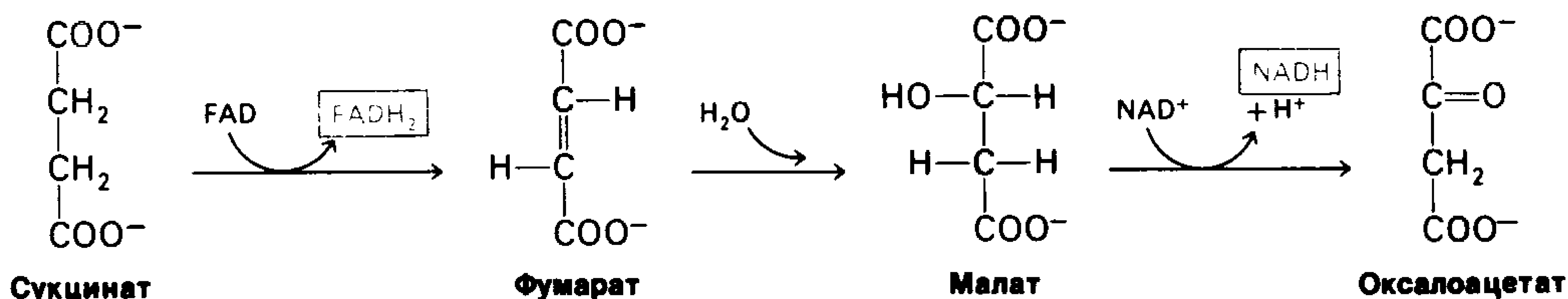
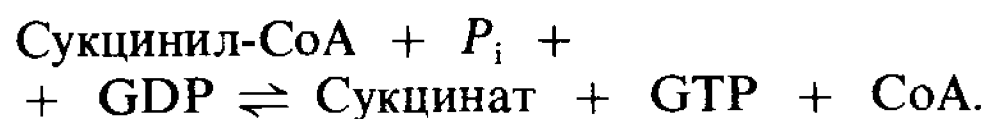


Рис. 13.4. Последняя стадия цикла трикарбоновых кислот: от сукцината к оксалоацетату.

сравнимо с этой величиной для ATP (– 7,3 ккал/моль). *Расщепление тиоэфирной связи сукцинил-CoA сопряжено с фосфорилированием гуанозиндифосфата* (GDP)[1]:



Сукцинил-CoA + P_i +
+ GDP ⇌ Сукцинат + GTP + CoA.

Эта легкообратимая реакция ($\Delta G^{0\prime}$ = = – 0,8 ккал/моль) катализируется *сукцинил-CoA—синтетазой.* Фосфорильная группа гуанозинтрифосфата (GTP) в ходе реакции, катализируемой *нуклеозиддифосфокиназой*, легко переносится на аденозиндифосфат (ADP) с образованием ATP.



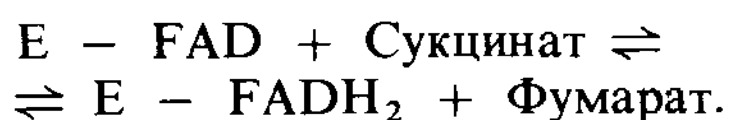
GTP + ADP ⇌ CDP + ATP.

Образование высокоэнергетической фосфатной связи из сукцинил-CoA представляет собою пример *субстратного фосфорилирования.* В самом деле, это единственная реакция цикла трикарбоновых кислот, непосредственно приводящая к образованию высокоэнергетической фосфатной связи. По контрасту с нею, в процессе *фосфорилирования, связанного с дыхательной цепью* (называемого также *окислительным фосфорилированием*), образование ATP сопряжено с окислением NADH или $FADH_2$ под действием O_2. Мы уже встречались ранее с субстратным фосфорилированием при анализе двух реакций гликолиза: окисления глицеральдегид-3-фосфата и превращения фосфоенолпирувата в пируват. Окислительному фосфорилированию посвящена следующая глава.

13.8. Регенерирование оксалоацетата при окислении сукцината

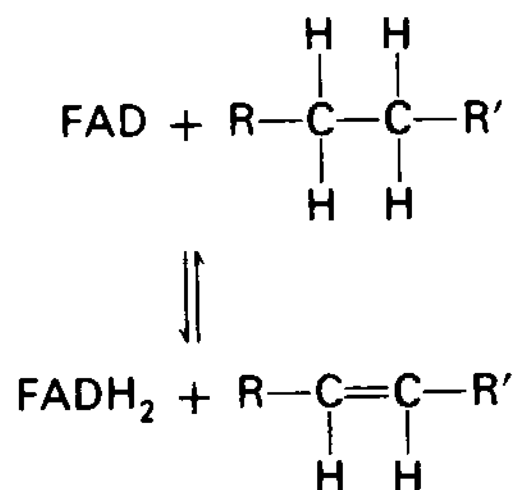
Реакции соединений, содержащих четыре атома углерода, составляют последнюю стадию цикла трикарбоновых кислот (рис. 13.4). Сукцинат превращается в оксалоацетат в три этапа: окисление, присоединение молекулы воды (гидратация) и вторая реакция окисления. Таким образом, при каждом обороте цикла происходит регенерирование одной молекулы оксалоацетата и одновременно улавливание энергии в форме $FADH_2$ и NADH.

Сукцинат окисляется в фумарат *сукцинат-дегидрогеназой.* Акцептором водорода в этой реакции служит FAD, а не NAD^+, который используется в трех других окислительных реакциях цикла. Роль акцептора водорода в этой реакции выполняет FAD, потому что изменение свободной энергии оказывается недостаточным для восстановления NAD^+. В реакциях такого типа функцию акцептора электронов почти всегда несет FAD. В молекуле сукцинат-дегидрогеназы изоаллоксазиновое кольцо FAD ковалентно связано с боковой цепью гистидина, входящего в состав фермента (E – FAD).



E – FAD + Сукцинат ⇌
⇌ E – $FADH_2$ + Фумарат.

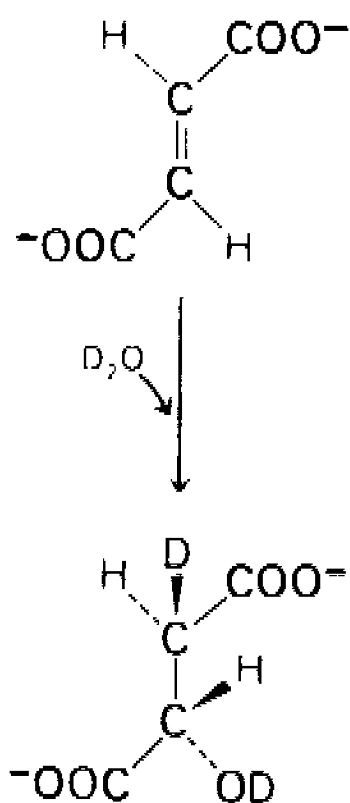
Молекула сукцинат-дегидрогеназы содержит кроме флавина четыре атома железа и четыре неорганических сульфида. Гем в состав этого фермента не входит. Атомы железа связаны с неорганическими сульфидами. Белки такого типа известны как *железосеропротеины* (Fe-S-белки), или *белки, содержащие негемовое железо.* Железосеропротеины играют важную роль в электронтранспортных системах митохондрий и хлоропластов (разд. 14.4 и 19.9). Сукцинат-дегидрогеназа состоит из компонен-



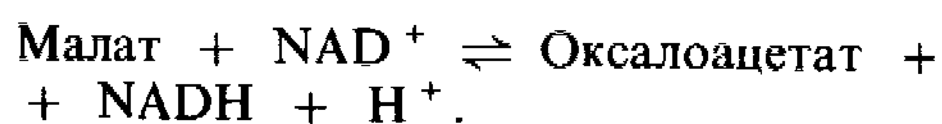
[1] В мышечной ткани голубя с ADP.–*Прим. ред.*

та 70 кДа, включающего FAD и два кластера FeS-белков, и компонента 27 кДа, содержащего единичный кластер белков. Этот фермент в отличие от других ферментов цикла трикарбоновых кислот является интегральным белком внутренней мембраны митохондрий. *Сукцинат-дегидрогеназа непосредственно связана с цепью переноса электронов.* $FADH_2$, образовавшийся при окислении сукцината, не отделяется от фермента (в противоположность NADH). Два электрона $FADN_2$ прямо переносятся на атомы Fe^{3+} фермента. Конечным акцептором этих электронов служит молекулярный кислород, что будет рассмотрено в гл. 14.

Следующий этап цикла – гидратация фумарата с образованием L-малата. *Фумараза* катализирует стереоспецифическое *транс*-присоединение H и OH, как было показано в исследованиях с использованием в качестве метки дейтерия. Поскольку OH-группа присоединяется только с одной стороны двойной связи фумарата, образуется исключительно L-изомер малата.



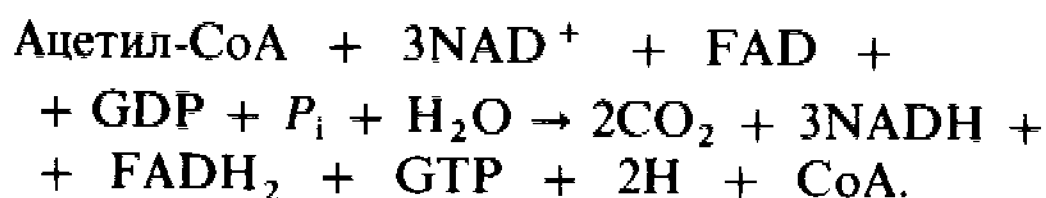
В конце концов малат окисляется, образуя оксалоацетат. Эта реакция катализируется *малат-дегидрогеназой*, и роль акцептора электронов в ней опять выполняет NAD^+.



$$\text{Малат} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Оксалоацетат} + NADH + H^+.$$

13.9. Стехиометрия цикла трикарбоновых кислот

Суммарная реакция цикла трикарбоновых кислот имеет следующий вид:



$$\text{Ацетил-CoA} + 3NAD^+ + FAD + GDP + P_i + H_2O \rightarrow 2CO_2 + 3NADH + FADH_2 + GTP + 2H + \text{CoA}.$$

Такая стехиометрия цикла трикарбоновых кислот (рис. 13.5 и табл. 13.1) обусловлена следующими реакциями.

1. Два атома углерода включаются в цикл при конденсации ацетильного компонента (из ацетил-COA) с оксалоацетатом. Два углеродных атома покидают цикл в форме CO_2 в ходе последующих реакций декарбоксилирования, катализируемых изоцитрат-дегидрогеназой и α-оксоглутарат-дегидрогеназой. Как будет вкратце обсуждаться ниже, атомы углерода, покидающие цикл, отличны от тех, которые в него включились.

2. Четыре пары атомов водорода покидают цикл в ходе четырех окислительных реакций. Две молекулы NAD^+ восстанавливаются в реакциях окислительного карбоксилирования изоцитрата и α-оксоглутарата, одна молекула FAD восстанавливается при окислении сукцината и одна молекула NAD^+ восстанавливается при окислении малата.

3. Одна высокоэнергетическая фосфатная связь (в форме GTP или ATP) генерируется из богатой энергией тиоэфирной связи сукцинил-CoA.

4. Потребляются две молекулы воды: одна в синтезе цитрата при гидролизе цитрил-CoA, вторая – при гидратации фумарата.

Заглядывая вперед, скажем, что NADH и $FADH_2$, образующиеся в цикле трикарбоновых кислот, окисляются в цепи переноса электронов (гл. 14). Генерирование ATP происходит при транспорте электронов от этих переносчиков на O_2, их конечный акцептор. На каждую молекулу NADH в митохондрии образуются три молекулы ATP, на каждую молекулу $FADH_2$ – две молекулы ATP. Отметим, что только одна высокоэнергетическая фосфатная связь в расчете на один ацетильный остаток образуется непосредственно в цикле трикарбоновых кислот. Одиннадцать фосфатных связей, более богатых энергией, генерируются при окислении трех молекул NADH и одной молекулы $FADH_2$ в цепи переноса электронов.

Молекулярный кислород непосредственно не участвует в цикле трикарбоновых кислот. Однако цикл функционирует лишь в аэробных условиях, поскольку NAD^+

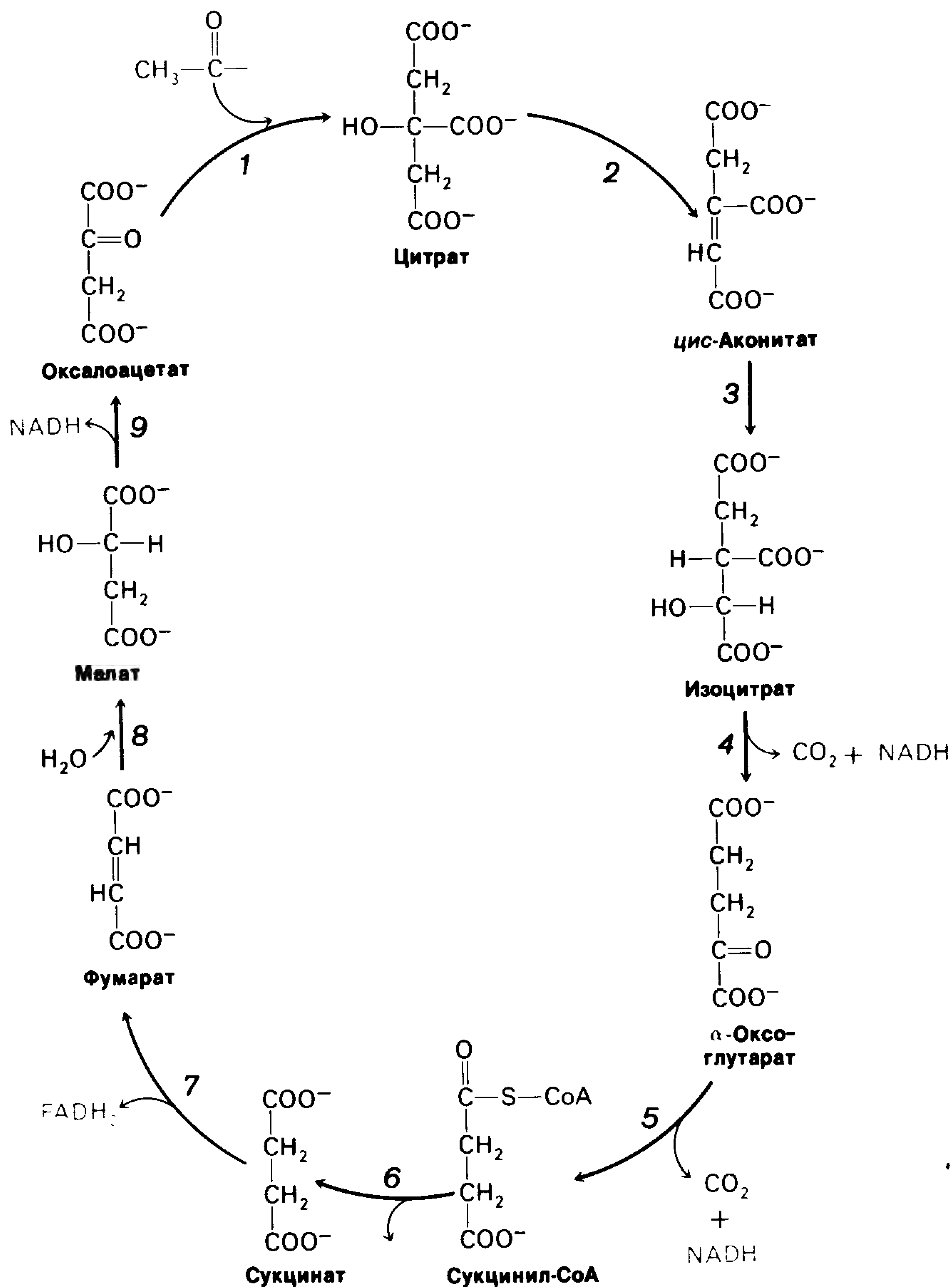


Рис. 13.5. Цикл трикарбоновых кислот.

и FAD в митохондрии могут быть регенерированы только при переносе электронов на молекулярный кислород. *Гликолиз в принципе может протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях, тогда как цикл трикарбоновых кислот носит строго аэробный характер.* Напомним, что гликолиз может протекать в анаэробных условиях по той причине, что в процессе превращения пирувата в лактат происходит регенерирование NAD^+.

13.10. Пируват-дегидрогеназный комплекс – организованная система ферментов

Обратимся теперь к механизму некоторых реакций. Окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-СоА катализируется *пируват-дегидрогеназным комплексом*, организованной системой трех видов ферментов (табл. 13.2). Превращения, катализируемые этим комплексом, описываются следующим сум-

Таблица 13.1. **Цикл трикарбоновых кислот**

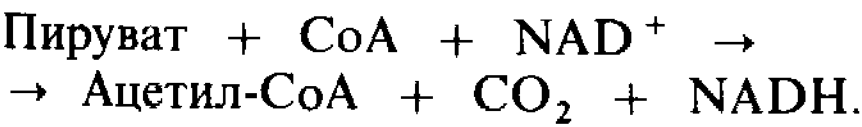
Стадия	Реакция	Фермент	Кофактор	Тип[1]	$\Delta G^{0\prime}$
1	Ацетил-CoA + Оксалоацетат + H_2O → Цитрат + + CoA + H^+	Цитрат-синтаза	CoA	а	− 7,5
2	Цитрат ⇌ *цис*-Аконитат + + H_2O	Аконитаза	Fe^{2+}	б	+ 2,0
3	*цис*-Аконитат + H_2O ⇌ Изоцитрат	Аконитаза	Fe^{2+}	в	− 0,5
4	Изоцитрат + NAD^+ ⇌ α-Оксоглутарат + CO_2 + NADH	Изоцитрат-дегидрогеназа	NAD^+	г + д	− 2,0
5	α-Оксоглутарат + NAD^+ + + CoA ⇌ Сукцинил-CoA + + CO_2 + NADH	α-Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс	NAD^+, CoA, ТПФ, липоевая кислота, FAD	г + д	− 7,2
6	Сукцинил-CoA + P_i + GDP ⇌ Сукцинат + GTP + CoA	Сукцинил-CoA—синтетаза	CoA	е	− 0,8
7	Сукцинат + FAD (связанный с ферментом) ⇌ фумарат + + $FADH_2$ (связанный с ферментом)	Сукцинат-дегидрогеназа	FAD	д	~ 0
8	Фумарат + H_2O ⇌ Малат	Фумараза	Нет	в	− 0,9
9	L-Малат + NAD^+ ⇌ Оксалоацетат + NADH + H^+	Малат-дегидрогеназа	NAD^+	д	+ 7,1

[1] Тип реакции: а – конденсация; б – дегидратация; в – гидратация; г – декарбоксилирование; д – окисление; е – субстратное фосфорилирование.

Таблица 13.2. **Пируват-дегидрогеназный комплекс** *E. coli*

Фермент	Сокращение	Число цепей в молекуле	Простетическая группа	Катализируемая реакция
Пируват-дегидрогеназный компонент	А или E_1	24	ТПФ	Декарбоксилирование пирувата
Дигидролипоил-трансацетилаза	В или E_2	12	Липоамид	Окисление C_2-фрагмента и перенос на CoA
Дигидролипоил-дегидрогеназа	С или E_3	12	FAD	Регенерирование окисленной формы липоамида

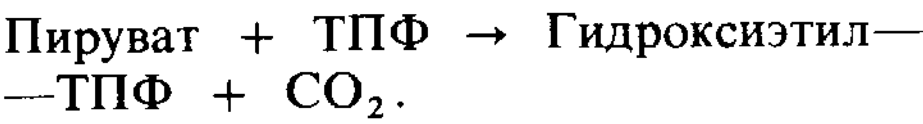
марным уравнением:



Пируват + CoA + NAD^+ →
→ Ацетил-CoA + CO_2 + NADH.

Механизм этой реакции гораздо сложнее, чем можно было бы думать, исходя только из ее стехиометрии. Помимо стехиометрических кофакторов CoA и NAD^+ в ней в качестве каталитических кофакторов участвуют *тиаминпирофосфат* (ТПФ), *липоамид* и *FAD*.

Превращение пирувата в ацетил-CoA происходит в четыре стадии. На первой стадии пируват соединяется с ТПФ и затем подвергается *декарбоксилированию*. Реакция катализируется *пируват-дегидрогеназным компонентом* мультиферментного комплекса.



Пируват + ТПФ → Гидроксиэтил—ТПФ + CO_2.

Решающее значение для данного процесса имеет следующая особенность ТПФ, простетической группы пируват-дегидрогеназного компонента: очень кислый характер атома углерода, находящегося между атомами азота и серы тиазолового кольца. Он ионизируется, образуя *карбанион*, который легко присоединяется к карбонильной группе пирувата.

Положительно заряженный азот в кольце ТПФ принимает на себя электроны, стабилизируя формирование отрицательного заряда, необходимого для декарбоксилирования. Затем протонирование приводит к образованию *гидроксиэтиламинпирофосфата.*

На второй стадии гидроксиэтильная группа, связанная с ТПФ, *окисляется* с образованием ацетильной группы и одновременно *переносится на липоамид.* Окислителем в этой реакции служит дисульфидная группа липоамида, которая превращается в сульфгидрильную группу. Реакция катализируется *дигидролипоил-*

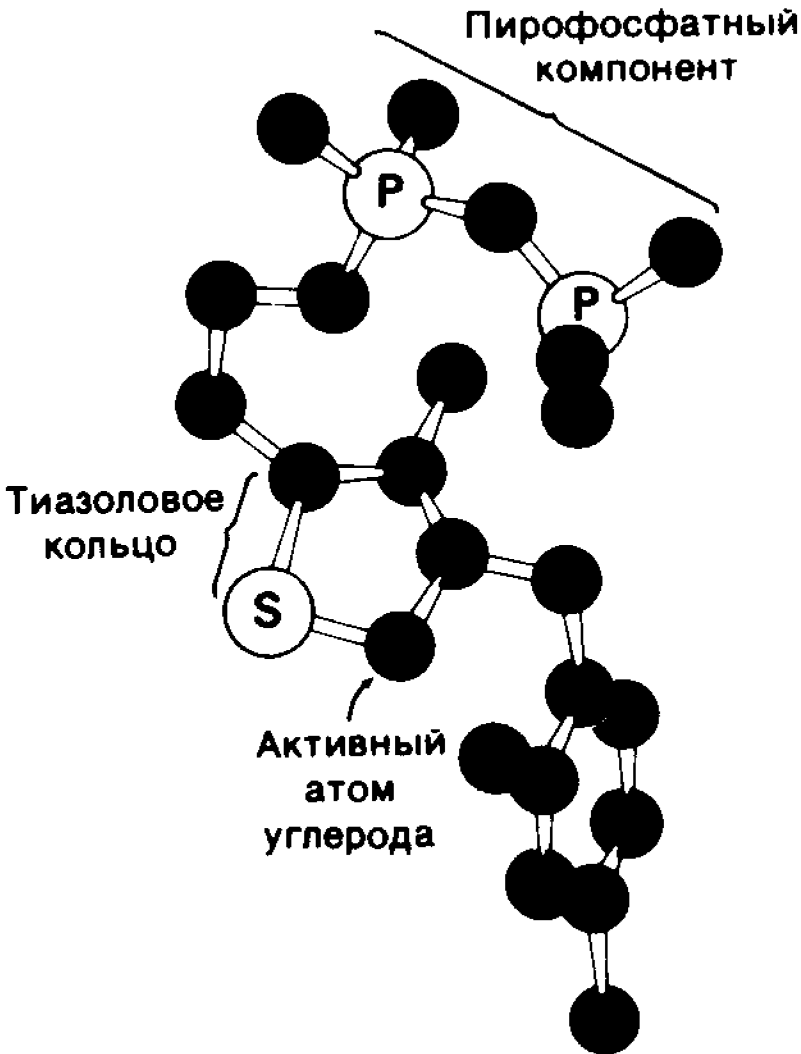
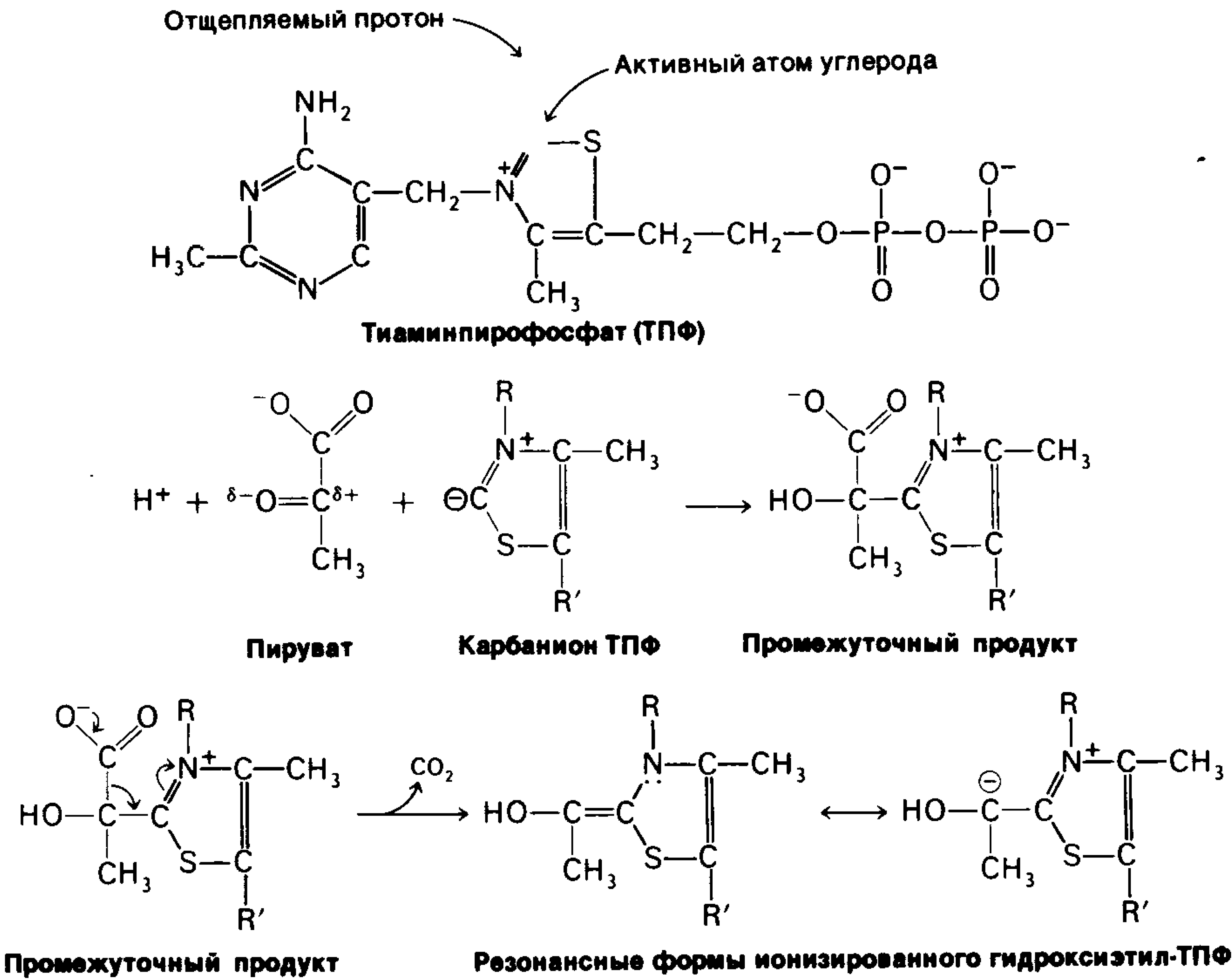


Рис. 13.6. Модель тиаминпирофосфата.

трансацетилазным компонентом комплекса и приводит к образованию *ацетиллипоамида.*

На третьей стадии *ацетильная группа переносится с ацетиллипоамида на CoA,*



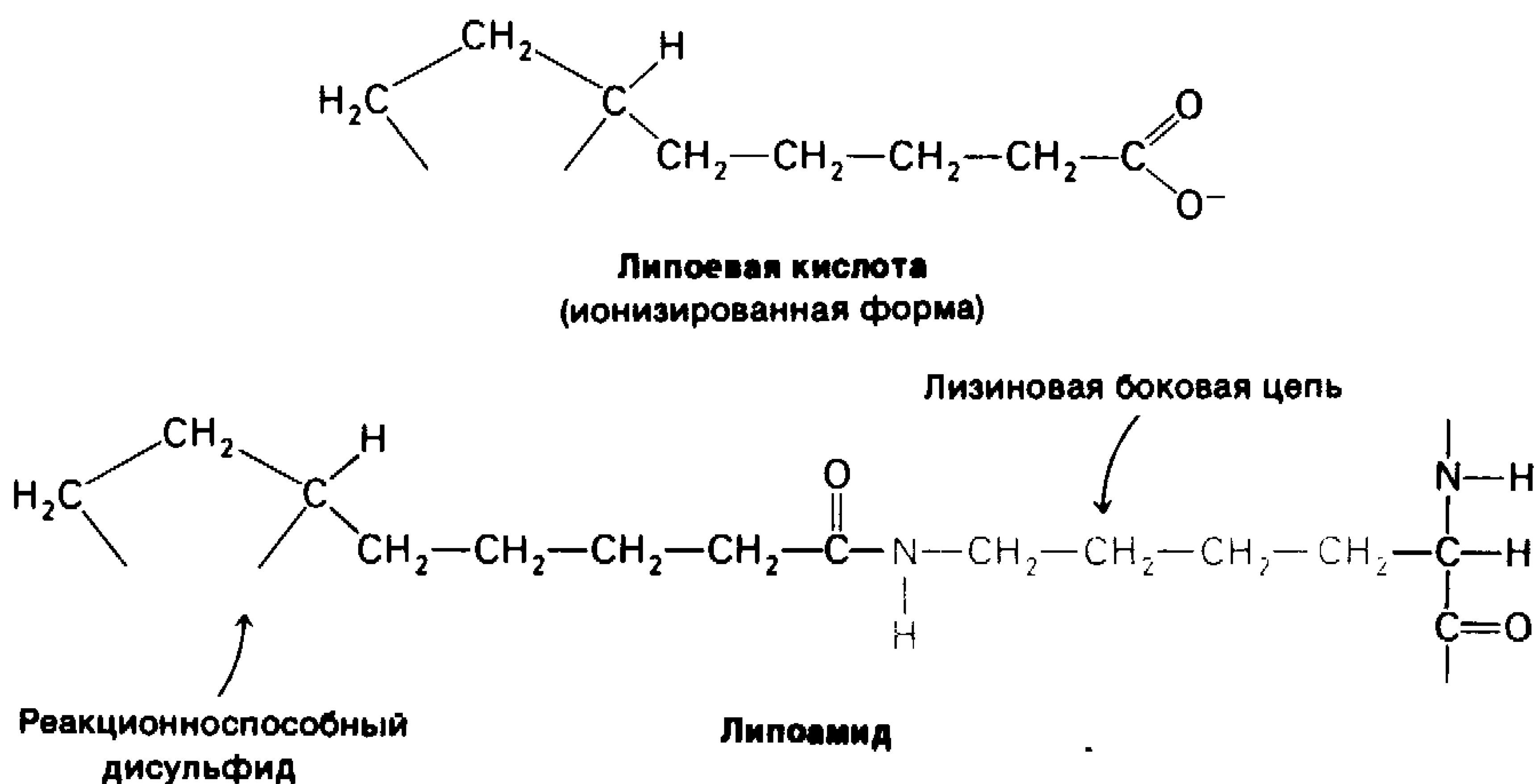
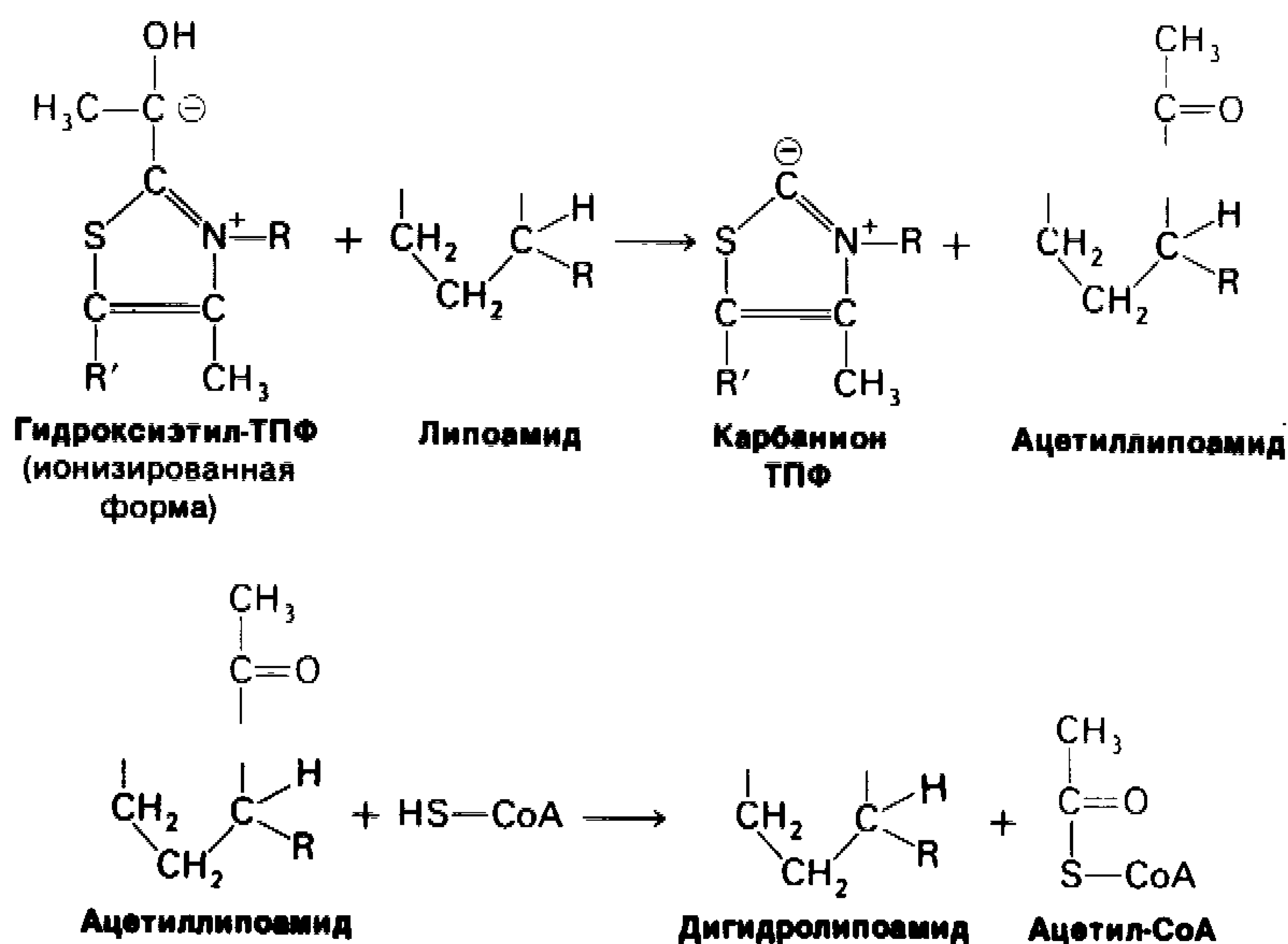


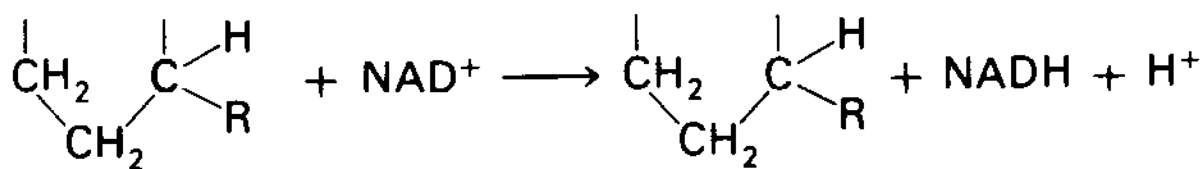
Рис. 13.7. Структура липоевой кислоты и липоамида. Липоевая кислота ковалентно присоединена к специфической лизиновой боковой цепи дигидролипоилтрансацетилазы. Отметим, что эта простетическая группа находится на конце длинной гибкой цепи, которая позволяет ей поворачиваться от одного активного центра к другому в составе ферментного комплекса.

На четвертой, завершающей стадии *происходит регенерирование окисленной формы липоамида.* Реакция катализируется *дигидролипоил-дегидрогеназным* компонентом комплекса. Окислителем в ней служит NAD^+, а роль простетической группы фермента выполняет FAD.

Источником сведений, проливших свет на структуру и сборку пируват-дегидрогеназного комплекса, явились исследования Лестера Рида (Lester Reed). Интенсивному изучению был подвергнут ферментный комплекс из *E. coli.* Было установлено, что



образуя ацетил-СоА. Процесс также катализируется дигидролипоил-трансацетилазой. При переходе ацетильной группы на СоА сохраняется богатая энергией тиоэфирная связь.



его мол. масса 4600 кДа и что он состоит из 48 полипептидных цепей. На электронной микрофотографии отчетливо видна структура многогранника с диаметром около 300 Å (рис. 13.9). *Ядро* (*сердцевину*) *пируват-дегидрогеназного комплекса составляют полипептидные цепи трансацетилазы.* Пируват-дегидрогеназный и липоил-дегидрогеназный компоненты связываются с наружной стороной этого ядра, состоящей из трансацетилазных компонентов (рис. 13.10).

Составляющие комплекс полипептидные цепи удерживаются вместе нековалентными силами. При щелочных значениях pH комплекс диссоциирует на пируват-дегидрогеназный компонент и субкомплекс из двух других ферментов. Трансацетилазу можно затем отделить от дегидрогеназы при нейтральных значениях pH в присутствии мочевины. После смешивания при нейтральном значении pH в отсутствие мочевины *происходит самопроизвольная ассоциация этих трех ферментов с образованием пируват-дегидрогеназного комплекса.* Таким образом, нативный ферментный комплекс может, по-видимому, образовываться путем самосборки.

Структурное объединение трех видов ферментов делает возможным координированный катализ при осуществлении сложной реакции (рис. 13.11). Все промежуточные продукты реакции окислительного декарбоксилирования пирувата прочно связываются с комплексом. Тесная близость между ферментами *увеличивает суммарную скорость процесса и сводит к минимуму побочные реакции.* Активированные промежуточные продукты переносятся от одного активного центра к другому липоа-

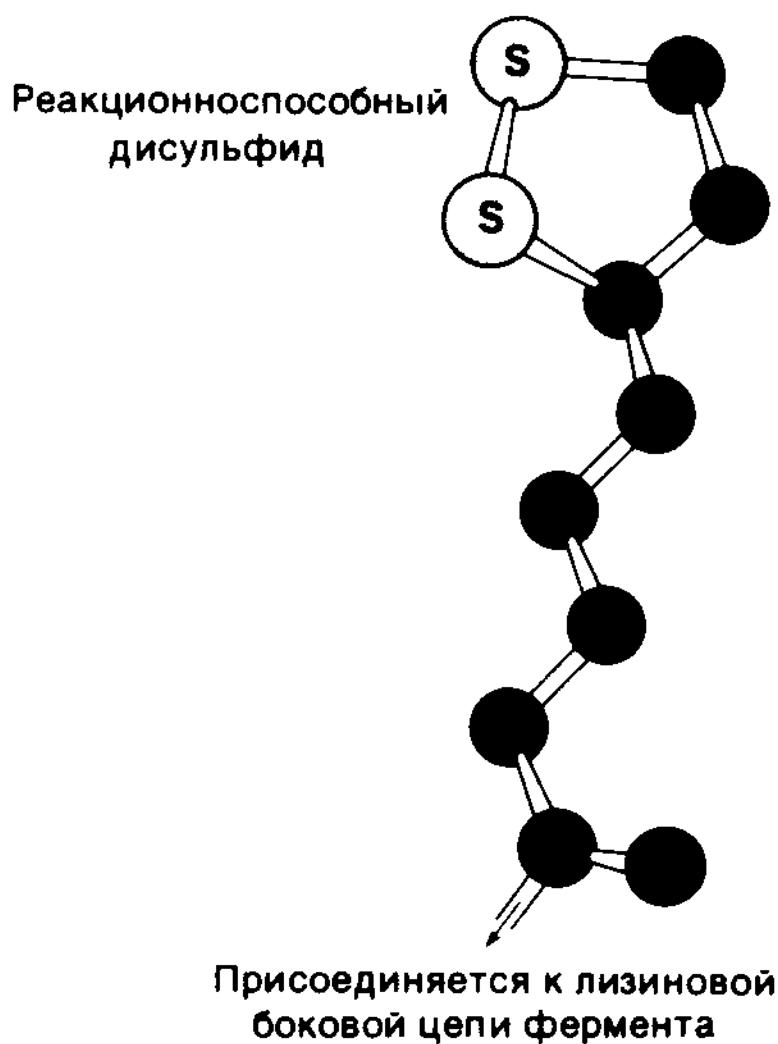


Рис. 13.8. Модель липоильной части липоамида.



Рис. 13.9. Электронная микрофотография пируват-дегидрогеназного комплекса из *E. coli.* (Печатается с любезного разрешения д-ра Lester Reed.)

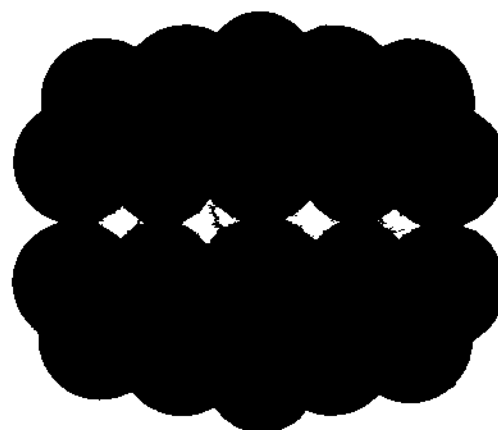


Рис. 13.10. Модель пируват-дегидрогеназного комплекса из *E. coli.* (Печатается с любезного разрешения д-ра Lester Reed.)

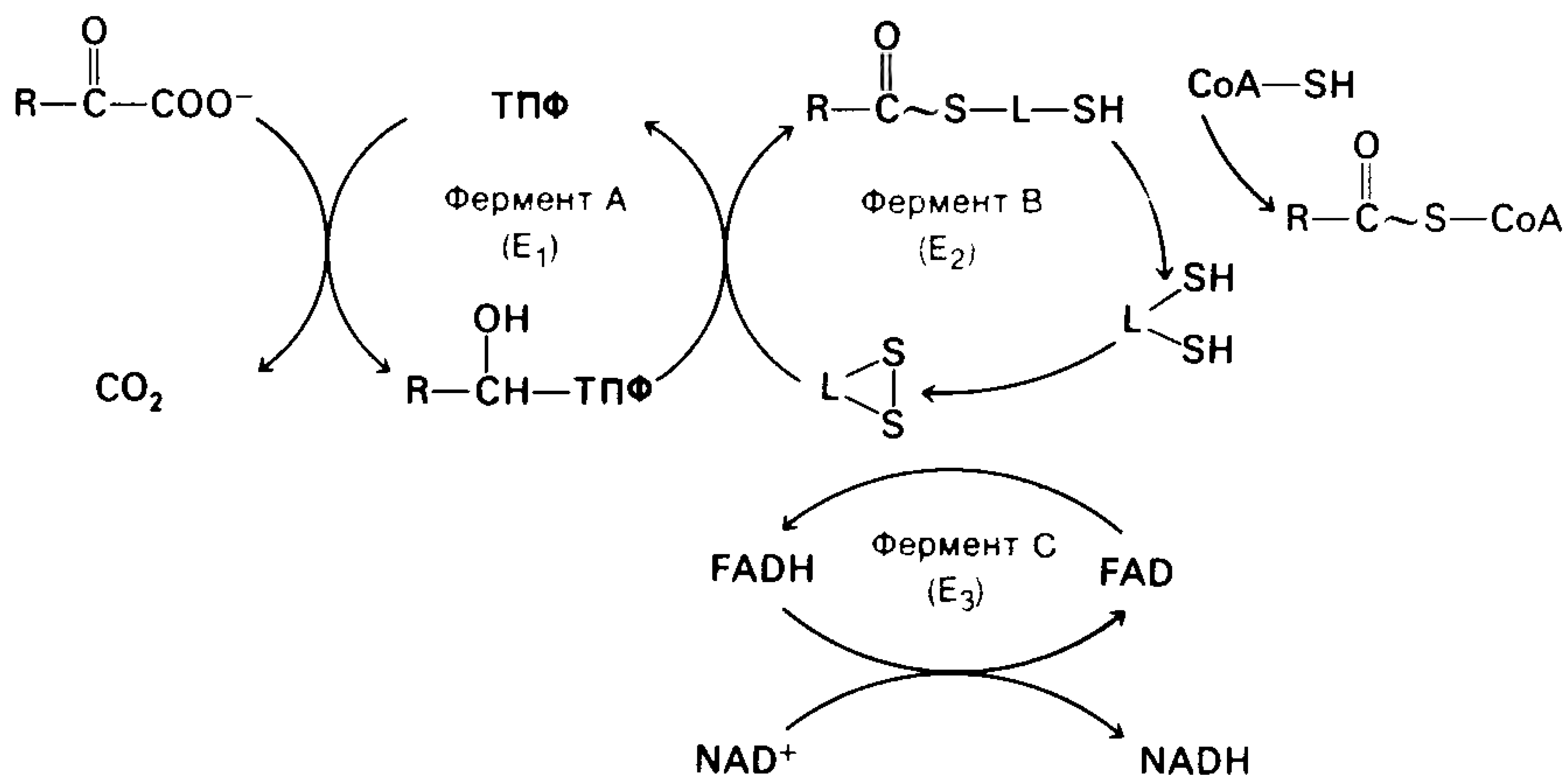
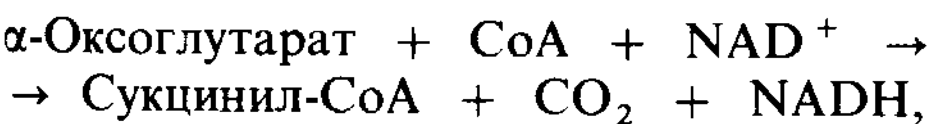


Рис. 13.11. Перечень реакций, катализируемых пируват-дегидрогеназным комплексом. L обозначает лияоильную группу.

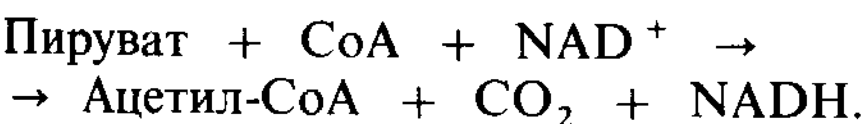
мидной простетической группой трансацетилазы. Присоединение липоильной группы к ε-аминогруппе лизинового остатка трансацетилазы создает гибкий рычаг для реакционноспособного кольца. Этот *молекулярный рычаг в 14 Å* способствует взаимодействию липоильной части трансацетилазной субъединицы с тиаминпирофосфатным компонентом соседней пируват-дегидрогеназной субъединицы и с флавиновым компонентом соседней липоилдегидрогеназы. Кроме того, липоильные компоненты мультиферментного комплекса могут реагировать друг с другом, образуя *сеть взаимодействующих реакционноспособных групп.* Заряд липоильного компонента в течение цикла его превращений составляет 0, -1 или -2 при полной ионизации сульфгидрильных групп. Эти изменения заряда могут служить движущей силой для направленного движения липоильной группы.

13.11. Вариации на мультиферментную тему: альфа-оксоглутарат-дегидрогеназный комплекс

Окислительное декабоксилирование α-оксоглутарата имеет много общего с соответствующим процессом для пирувата:



α-Оксоглутарат + CoA + NAD^+ →
→ Сукцинил-CoA + CO_2 + NADH,



Пируват + CoA + NAD^+ →
→ Ацетил-CoA + CO_2 + NADH.

В обеих реакциях участвуют одни и те же кофакторы: ТПФ, липоамид, CoA, FAD и NAD^+. По существу *окислительное декарбоксилирование α-оксоглутарата катализируется ферментным комплексом, сходным по структуре с пируват-дегидрогеназным комплексом.* В состав α-оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса входят три вида ферментов: α-оксоглутарат-дегидрогеназный (A′), транссукцинилазный (B′) и дигидролипоил-дегидрогеназный (C′) компоненты. Далее, A′ связывается с B′ и B′ связывается с C′, но A′ с C′ непосредственно не связывается. Таким образом, *ядро комплекса составляет транссукцинилаза* (аналогично трансацетилазе).

α-Оксоглутарат – дегидрогеназный компонент (A′) и транссукцинилаза (B′) отличаются от соответствующих ферментов (A и B) пируват-дегидрогеназного комплекса. В то же время *дигидролипоил-дегидрогеназные части (C и C′) обоих комплексов идентичны.* Опыты с реконструированием этих систем показали, что комплекс, образованный A, B и C′, также активен в отношении окислительного декарбоксилирования пирувата, как комплекс из A, B и C. Подобно этому, C и C′ взаимозаменяемы при образовании реконструированного комплекса, осуществляющего окислительное декарбоксилирование α-оксоглутарата.

Как ранее было отмечено, химотрипсин, трипсин, тромбин и эластаза являются гомологичными ферментами. Здесь мы видим, что пируват- и α-оксоглутарат – – дегидрогеназные комплексы представляют собою *гомологичные ассоциации ферментов.* Структурные и механистиче-

ские особенности, обеспечивающие координированный катализ на входе в цикл трикарбоновых кислот, вновь используются позднее в процессе функционирования этого цикла.

13.12. Бери-бери вызывается недостаточностью тиамина

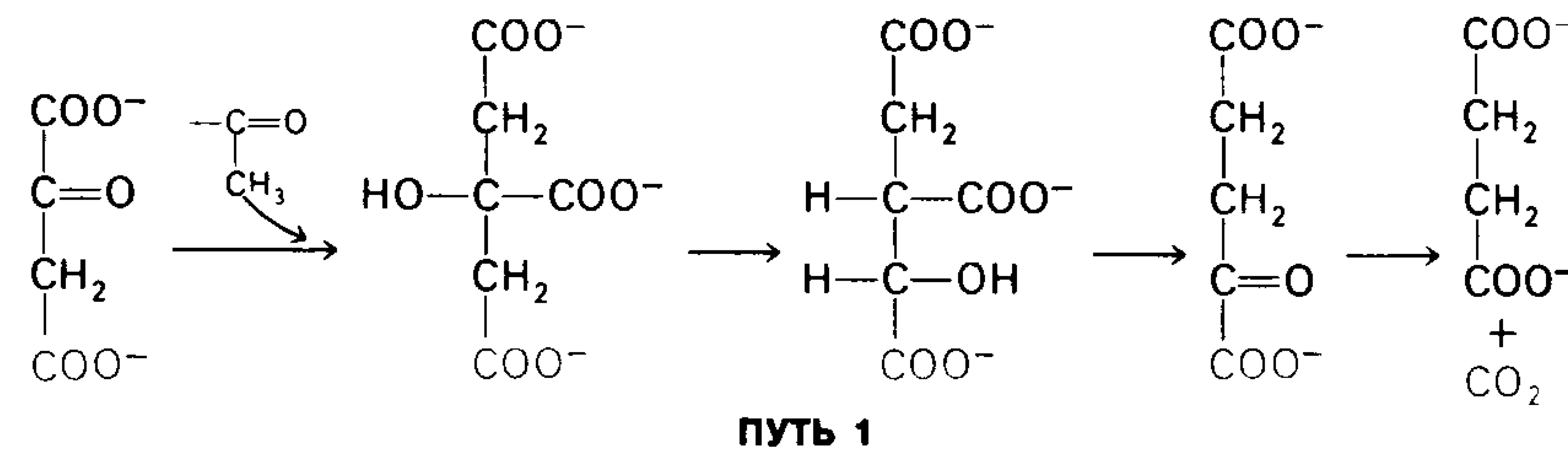
«Одно очень мучительное заболевание, которое поражает человека, названо местными жителями бери-бери (что означает «овца»). Я видел тех, кого поразила эта болезнь. У них дрожат колени, они высоко поднимают ноги и ходят подобно овцам. Это вид паралича или скорее тремора. У больных наблюдаются отклонения в характере движений, нарушается чувствительность рук и ног, а иногда и всего тела...» Так описал бери-бери датский врач Якобус Бонитус (Jacobus Bonitus) в 1630 г., когда он работал на острове Ява.

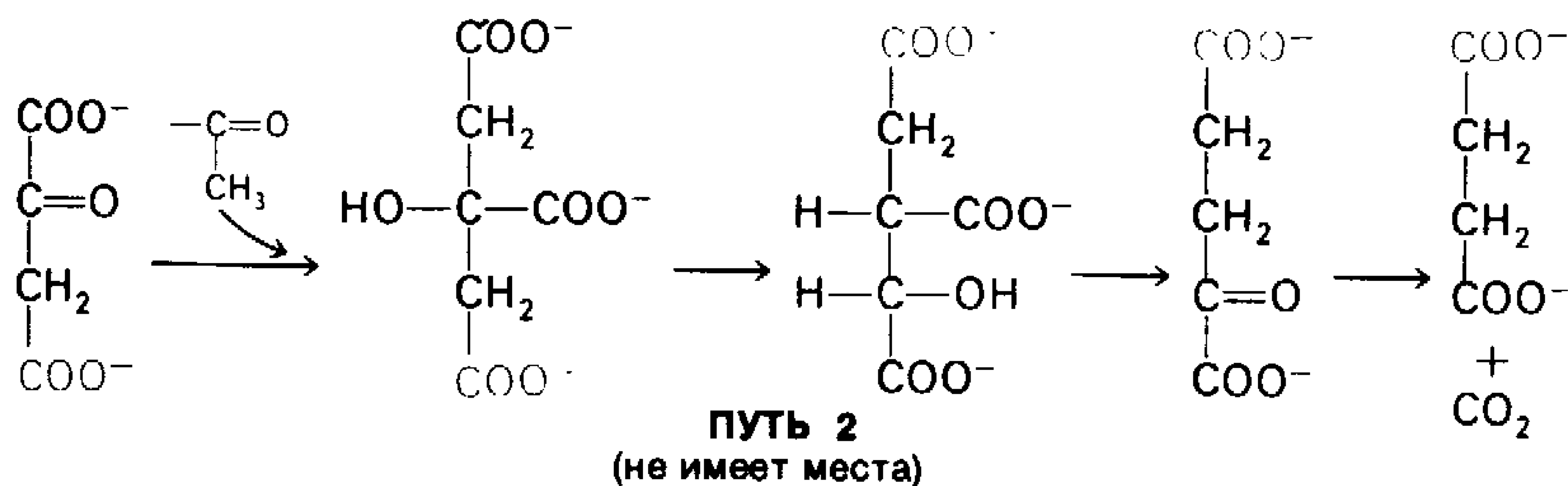
Бери-бери вызывается недостатком в пище тиамина (называемого также витамином B_1). Болезнь была и остается серьезной проблемой для жителей Дальнего Востока, поскольку рис, их основной продукт питания, беден тиамином. Проблема еще обостряется использованием в пищу полированного риса, потому что только наружный слой рисового зерна содержит заметные количества тиамина. Бери-бери иногда встречается при остром истощении у алкоголиков. Болезнь характеризуется симптомами неврологических заболеваний и сердечной недостаточности. Повреждение периферической нервной системы проявляется в виде болей в конечностях, мышечной слабости, нарушения кожной чувствительности. Сердце может быть увеличено, а минутный объем пониженным.

Каким же образом недостаточность тиамина вызывает эти симптомы? Тиаминпирофосфат служит простетической группой трех важных ферментов: пируват-дегидрогеназы, α-оксоглутарат—дегидрогеназы и транскетолазы. Транскетолаза переносит двухуглеродные компоненты с одного сахара на другой; ее роль в пентозофосфатном пути будет рассматриваться позднее. Общей особенностью ферментативных реакций, протекающих с использованием ТПФ, является перенос активированного альдегидного фрагмента. При бери-бери содержание пирувата и α-оксоглутарата в крови превышает норму. Увеличение содержания пирувата особенно выражено после приема глюкозы. В соответствии с этим ферментативные активности пируват- и α-оксоглутарат-дегидрогеназных комплексов in vivo снижены по сравнению с нормой. Кроме того, при бери-бери снижена транскетолазная активность эритроцитов. Определение активности этого фермента может применяться для диагностики данного заболевания.

13.13. Симметричные молекулы могут реагировать асимметрично

Проследим судьбу определенного углеродного атома в цикле трикарбоновых кислот. Предположим, что в оксалоацетате изотопом ^{14}C помечен карбоксильный углерод, наиболее удаленный от оксогруппы. Анализ образовавшегося α-оксоглутарата покажет, что потери радиоактивной метки не происходит. Декарбоксилирование α-оксоглутарата приведет тогда к образованию сукцината, лишенного радиоактивности, а вся метка будет содержаться в высвободившемся CO_2. Тот факт, что *вся* метка обнаруживается в составе CO_2, явился полной неожиданностью. Цитрат–молекула симметричная. Поэтому считалось, что две его $—CH_2COO^-$-группы должны реагировать идентично. Значит, предполагалось далее, на каждую молекулу цитрата, превращающуюся по пути 1, должна приходиться другая молекула цитрата, превращающаяся по пути 2. Если это так, то в составе CO_2 должна появляться только *половина* метки.





Эти эксперименты, проведенные в 1941 г., были интерпретированы таким образом, что, поскольку превращение метки носит асимметричный характер, цитрат (или какое-либо другое симметричное соединение) не может быть промежуточным продуктом при образовании α-оксоглутарата. Такая интерпретация казалась неоспоримой до 1948 г., когда Александр Огстон (Alexander Ogston) проницательно указал на ошибочность утверждения, что две идентичные группы в симметричной молекуле не могут быть дифференцированы ферментом: «Напротив, возможно, что *асимметричный фермент, действующий на симметричное соединение, может различать его идентичные группы*... асимметричное распределение изотопа в продукте реакции не может считаться аргументом против его образования из симметричного предшественника».

Проанализируем утверждение Огстона. Для простоты рассмотрим молекулу, в которой два водородных атома, группа X и другая группа Y связаны с тетраэдрическим атомом углерода. Обозначим один водород А, второй – В. Предположим теперь, что фермент связывает три группы этого субстрата: X, Y и H. Может ли он отдифференцировать H_A от H_B? На рис. 13.12 показано связывание X, Y и H_A с тремя участками фермента. Отметим, что X, Y и H_B не могут быть связаны с этим активным центром, вернее, могут быть связаны две группы, но не все три. Таким образом, *судьба H_A и H_B должна быть различной*.

Следует заметить, что H_A и H_B стерически неэквивалентны, несмотря даже на то, что молекула $CXYH_2$ лишена оптической активности. Точно так же стерически неэквивалентны $—CH_2COO^-$-группы цитрата, несмотря на отсутствие оптической активности у цитрата. *Правила симметрии, которые определяют, имеются ли в соединении неразличимые заместители, отличаются от правил, определяющих, является ли оно оптически неактивным*: 1) молекула оптически неактивна, если она может быть наложена на свое зеркальное отражение; 2) молекула имеет неразличимые заместители только в том случае, если эти группы совпадают при вращении, когда остальная структура остается без изменения.

Стерически неэквивалентные группы, такие, как H_A и H_B, почти всегда различаются при ферментативных реакциях. Смысл дифференциации этих групп состоит в том, что фермент удерживает субстрат в состоянии специфической ориентации. Присоединение

Таблица 13.3. **Обычно применяемые радиоактивные изотопы**

Изотоп	Период полужизни	Изотоп	Период полужизни
^{3}H	12,26 года	^{42}K	12,36 ч
^{14}C	5730 лет	^{45}Ca	163 сут
^{22}Na	2,62 года	^{59}Fe	45,6 сут
^{32}P	14,28 сут	^{125}I	60,2 сут
^{35}S	87,9 сут	^{203}Hg	46,9 сут

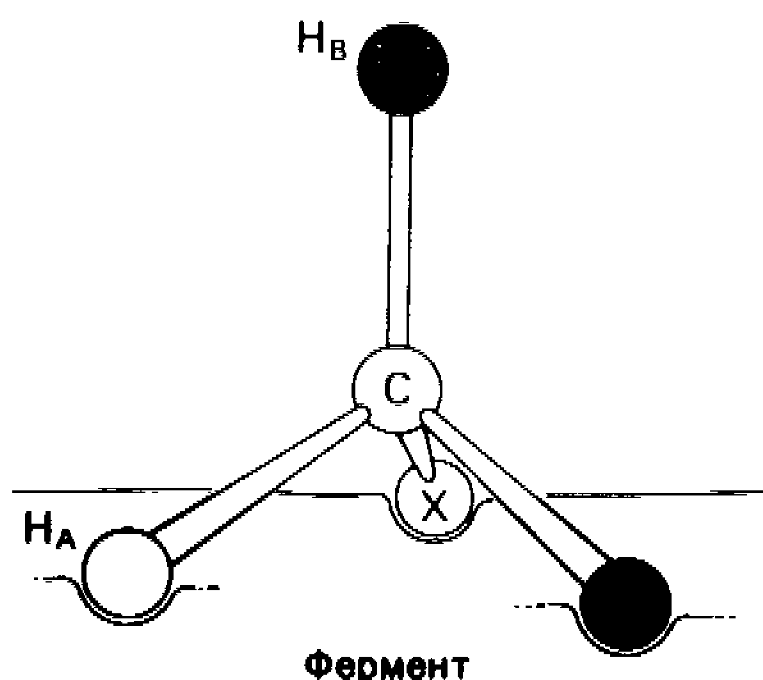


Рис. 13.12. H_A и H_B стерически неэквивалентны, если субстрат $CXYH_2$ связао с ферментом в трех участках.

Хиральность –

«Я называю геометрическую фигуру или группу точек хиральной и говорю, что она обладает хиральностью, если ее идеально реализованное отражение в плоском зеркале не совпадает с ней при наложении».

Кельвин (1893 г.)

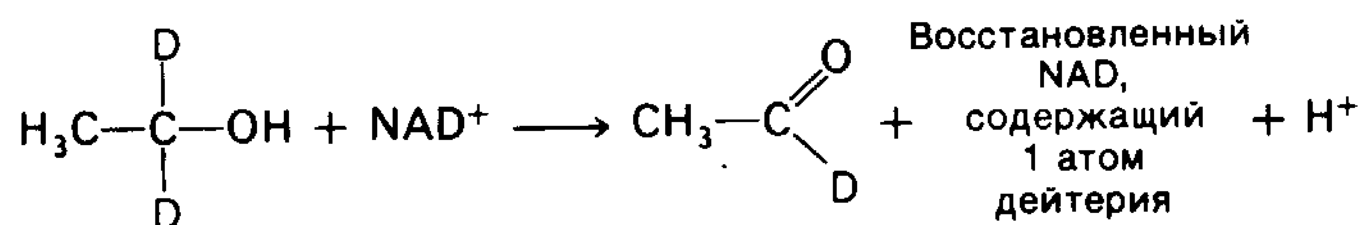
Происходит от греч. cheir – рука.

по трем точкам, как показано на рис. 13.12,– наглядный, но не единственный путь к достижению особой ориентации субстрата.

Термины «хиральный» и «прохиральный» теперь широко используются при описании стереохимии молекул. *Хиральная* молекула обладает асимметрией и, следовательно, является оптически активной. *Прохиральная* молекула, такая, как цитрат или $CXYH_2$, лишена асимметрии и соответственно оптически неактивна. Однако она может стать хиральной в результате всего лишь одного этапа. Прохиральная молекула (такая, как $CXYH_AH_B$) превращается в хиральную ($CXYZH_B$) при замещении одного из ее идентичных атомов или одной из групп (в данном примере – H_A). Приставки *R* и *S* используются для определенного обозначения хиральных и прохиральных центров, как описано в приложении к данной главе (стр. 69).

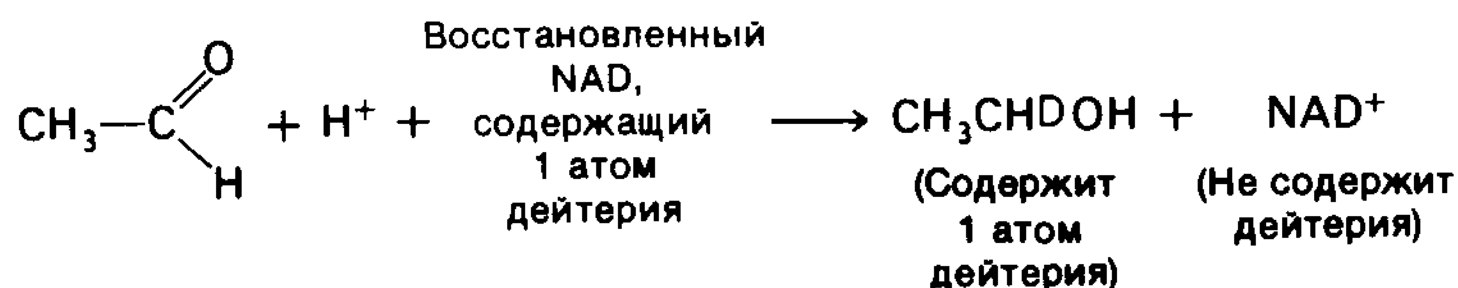
13.14. Стереоспецифический перенос водорода NAD^+-дегидрогеназами

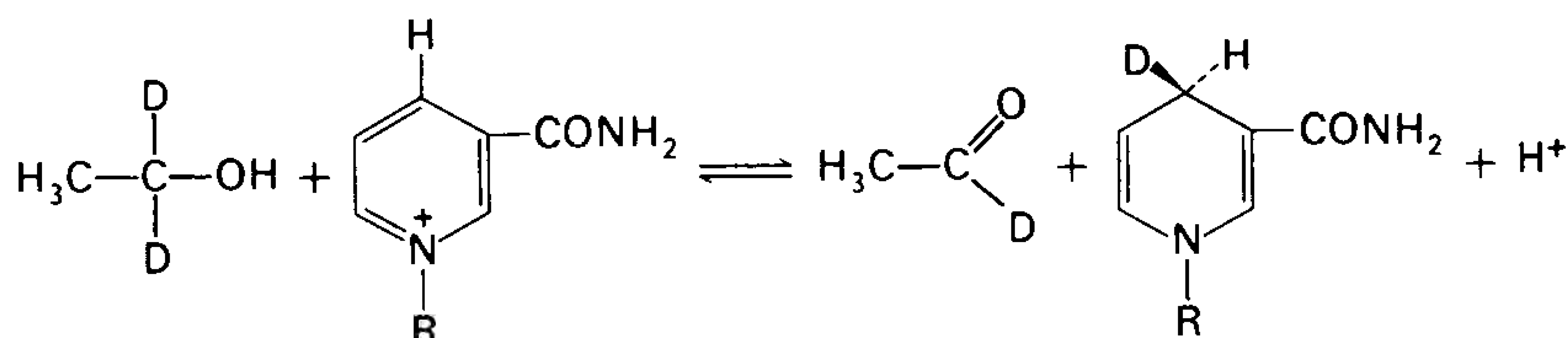
В 50-х годах Бриджит Веннесланд, Франк Вестхеймер (Brigit Vennesland, Frank Westheimer) и их сотрудники провели изящный эксперимент по стереоспецифичности переноса водорода NAD^+-дегидрогеназами. Субстратом реакции, катализируемой алколь-дегидрогеназой, был этанол, меченный двумя атомами дейтерия при С-1. Было установлено, что восстановленный кофермент содержит один атом дейтерия на молекулу, тогда как второй атом дейтерия входит в состав ацетальдегида. Таким образом, потери дейтерия и перехода его в растворитель не происходило, и он прямо переносился с субстрата на NAD^+.



Дейтерированный восстановленный кофермент, образующийся в этой реакции, использовали затем для восстановления ацетальдегида. Результат оказался поразительным: *дейтерий целиком переносился с кофермента на субстрат* и совсем не обнаруживался в составе NAD^+.

Эти реакции доказывают стереоспецифичность переноса, катализируемого алкоголь-дегидрогеназой. *Положения, занимаемые двумя атомами водорода при С-4 в NADH, неравноценны.* Один из них (H_A) находится впереди, второй (H_B) – позади плоскости расположения никотинамида. Иными словами, С-4 представляет собою *прохиральный центр.* Алкоголь-дегидрогеназа, хиральный





реагент, различает положения А и В при С-4. Дейтерий переносится от дейтерированного этанола только в положение А. При обратной реакции атом дейтерия удаляется из положения А и прямо переносится на ацетальдегид.

Некоторые дегидрогеназы, такие, например, как глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа, переносят водород в положение В. Таким образом, *существуют два класса* NAD^+ *(и* $NADP^+$*)-дегидрогеназ: А-стереоспецифическая и В-стереоспецифическая.* Сравнение трехмерных структур NAD^+-дегидрогеназ показывает, что различие в стереоспецифичности ферментов А- и В-типов возникает вследствие поворота никотинамидного кольца на 180° по отношению к соседнему рибозному компоненту. В результате этого сдвига на 180° в А- и В-дегидрогеназах экспонируются и, следовательно, становятся реакционноспособными элементы противоположной стороны никотинамидного кольца. Как и можно было ожидать, все известные дегидрогеназы стереоспецифичны. Когда дегидрогеназа реагирует с рядом субстратов, стереоспецифичность переноса водорода для всех них одинакова. Сохранение NAD^+-связывающих мест в ходе эволюции подчеркивается тем фактом, что стереоспецифичность отдельной дегидрогеназы не зависит от вида организма (так, алкоголь-дегидрогеназы дрожжей и лошади имеют одинаковую стереоспецифичность). Более того, стереоспецифичность определенной реакции, катализируемой ферментами, использующими и NAD^+ и $NADP^+$, оказывается одной и той же для обоих коферментов.

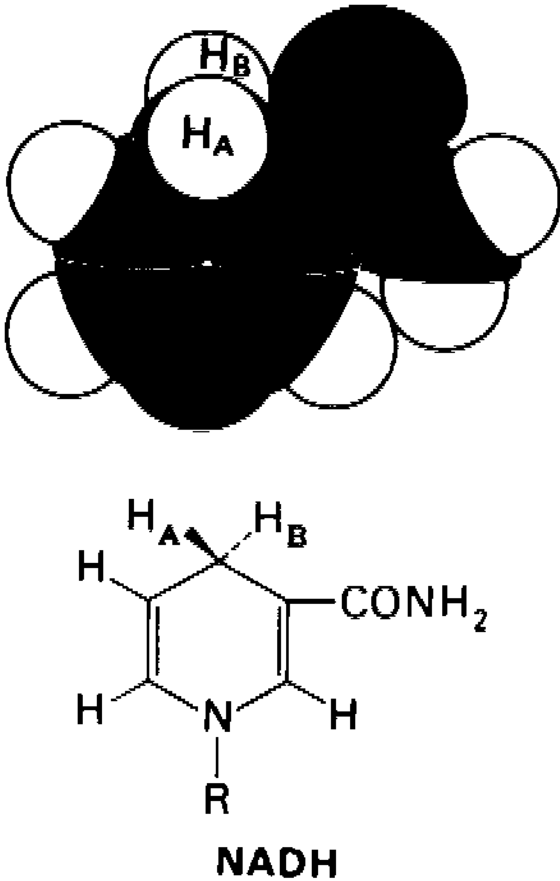
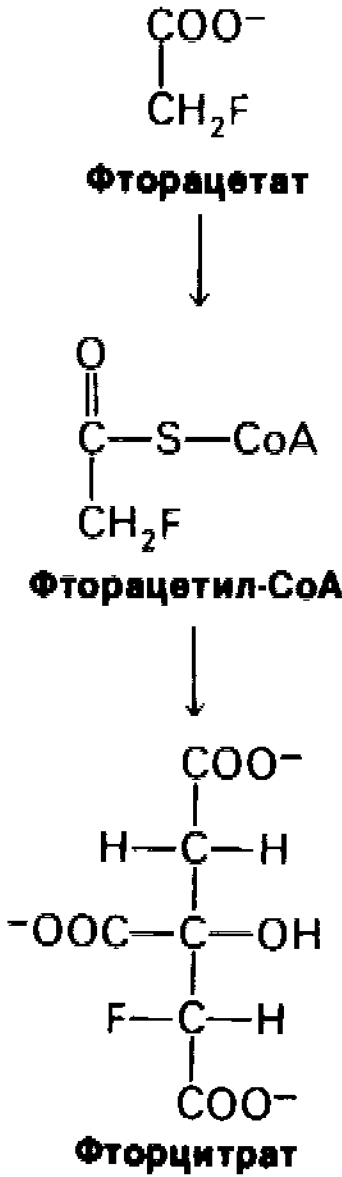


Рис. 13.13. Модель и формула никотинамидного компонента NADH, показывающая, что H_A и H_B находятся на противоположных сторонах кольца. По *RS*-номенклатуре H_A – *про-R*, H_B – *про-S*.

13.15. Летальный синтез: превращение фторацетата во фторцитрат

Цикл трикарбоновых кислот блокируется у животных, поедающих листья *Dichapetalum cymosum*, ядовитого южноафриканского растения. В течение часа содержание цитрата в большинстве органов возрастает более чем в 10 раз. У отравленных животных начинаются судороги, и они обычно погибают через короткое время. Токсическим агентом этих листьев является *фторацетат*, который используется также в качестве крысиного яда. Однако фторацетат не действует на очищенные ферменты цикла трикарбоновых кислот. Почему же тогда этот цикл блокируется при потреблении фторацетата in vivo? Объясняется это тем, что в организме *фторацетат подвергается ферментативному превращению во фторцитрат, мощный ингибитор аконитазы.* Фторацетат активируется во фторацетил-СоА, который затем конденсируется с оксалоацетатом, образуя фторцитрат.



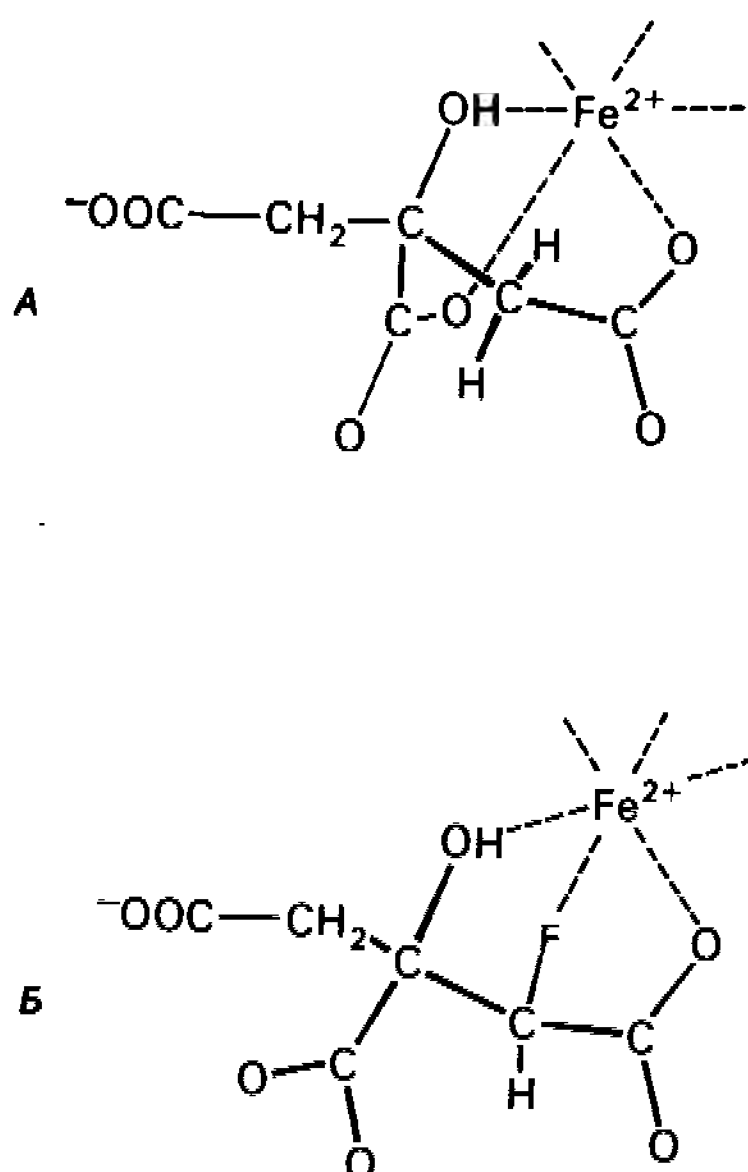
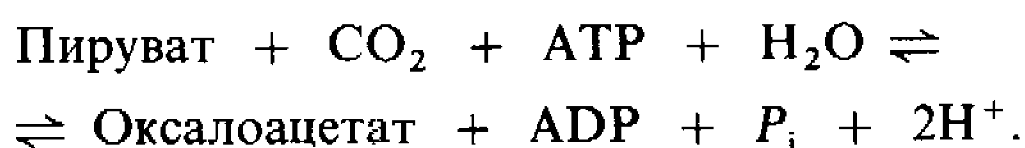


Рис. 13.14. Предполагаемая модель связывания цитрата и фторцитрата с активным центром аконитазы: *А*–связывание цитрата, приводящее к катализу; *Б*–связывание фторцитрата, приводящее к ингибированию. Атом фтора фторцитрата образует хелат с ионом железа в активном центре. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jenny Glusker.)

Активный центр аконитазы содержит ион Fe^{2+}, который в норме образует хелаты с атомом кислорода гидроксильной группы и двумя атомами кислорода карбоксильных групп цитрата. Фторцитрат в противоположность этому связывается таким образом, что его атом фтора образует хелат с ионом железа (рис. 13.14). Высокий электроотрицательный заряд фтора способствует его сильному взаимодействию с Fe^{2+}, что приводит к ингибированию фермента. Важно отметить, что превращение фторацетата в фторцитрат–не единственный случай синтеза, приводящего к летальному исходу. *Многие химические вещества, сами по себе относительно безобидные, могут под действием ферментов превращаться в очень вредные соединения.* Например, некоторые полициклические ароматические углеводороды подвергаются in vivo ферментативной модификации в мощные мутагены и канцерогены (разд. 20.21).

13.16. Цикл трикарбоновых кислот – источник предшественников для процессов биосинтеза

До сих пор, обсуждая цикл трикарбоновых кислот, мы рассматриваем его как *основной путь расщепления, обеспечивающий генерирование ATP.* Однако цикл трикарбоновых кислот выполняет и другую роль: он *поставляет промежуточные продукты для процессов биосинтеза* (рис. 13.15). Например, большинство углеродных атомов в порфиринах происходит из *сукцинил-CoA.* Многие аминокислоты происходят из *α-оксоглутарата и оксалоацетата.* Биосинтез этих соединений мы рассмотрим в последующих главах. Здесь же необходимо отметить тот важный момент, что *потребление промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот для целей биосинтеза обязательно должно сопровождаться их пополнением.* Предположим, например, что оксалоацетат превращается в аминокислоты, используемые для биосинтеза белка. Если при этом не будет происходить синтеза оксалоацетата de novo, то функционирование цикла трикарбоновых кислот прекратится, поскольку ацетил-CoA может включиться в цикл только после конденсации с оксалоацетатом. Как происходит пополнение оксалоацетата? Млекопитающие лишены ферментативного механизма, обеспечивающего превращение ацетил-CoA в оксалоацетат или другой промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот. Оксалоацетат у них образуется путем карбоксилирования пирувата, катализируемого пируват-карбоксилазой (разд. 15.15).



$$\text{Пируват} + CO_2 + ATP + H_2O \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons \text{Оксалоацетат} + ADP + P_i + 2H^+.$$

Карбоксилирование пирувата является примером *анаплеротической реакции* (от греч.– «пополнять»).

13.17. Регуляция пируват-дегидрогеназного комплекса

Образование ацетил-CoA из пирувата–это ключевой необратимый этап метаболизма, потому что *животные неспособны к превращению ацетил-CoA в глюкозу.* Окислитель-

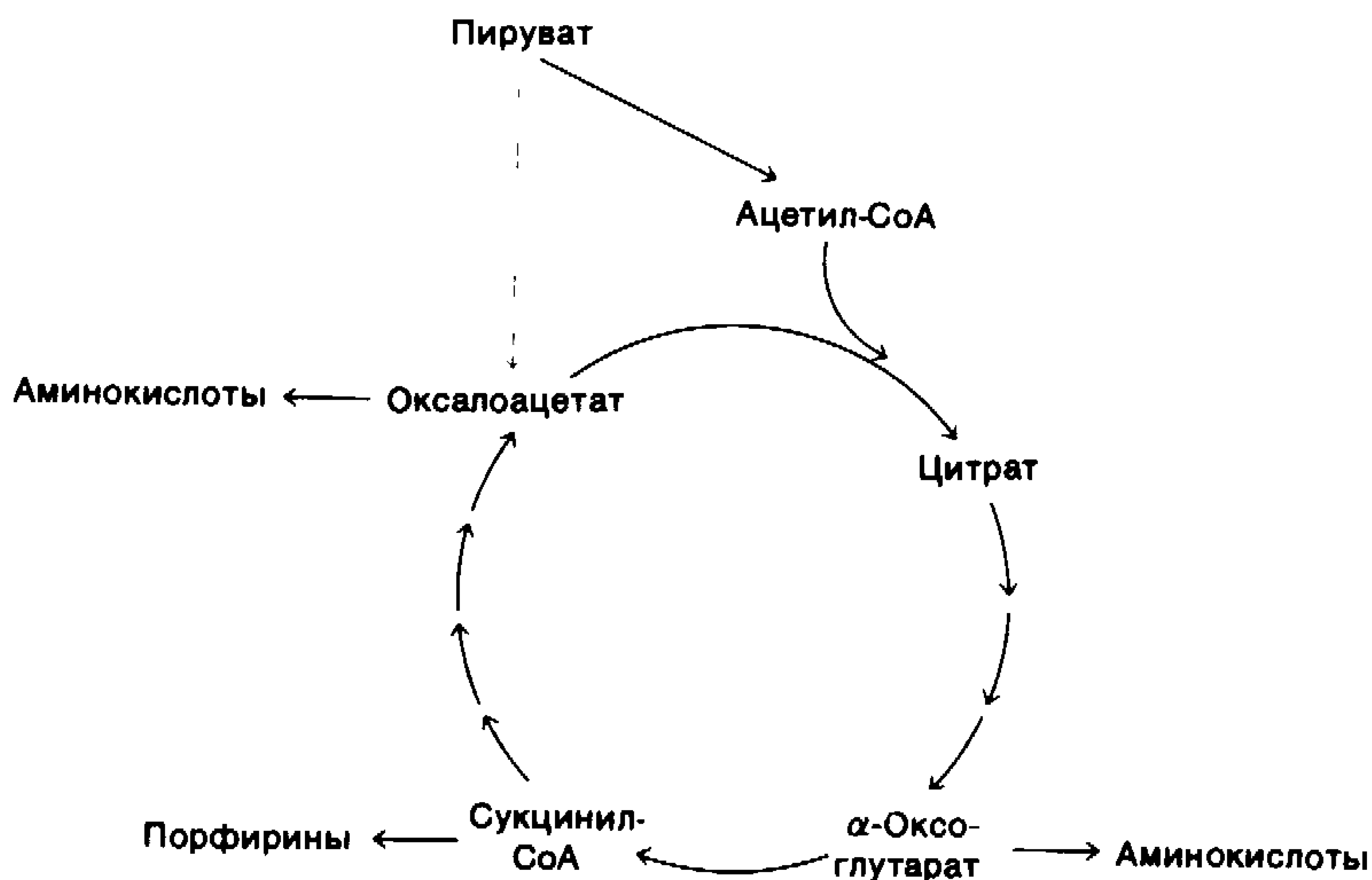


Рис. 13.15. Роль цикла трикарбоновых кислот в процессах биосинтеза. Промежуточные продукты, выводимые из цикла в результате их использования на нужды биосинтеза (показано красными стрелками), восполняются образоваоием оксалоацетата из пирувата.

ное декарбоксилирование пирувата в ацетил-СоА создает потенциальную возможность для дальнейших превращений атомов глюкозы по двум путям: 1) окисление до CO_2 через цикл трикарбоновых кислот с одновременным генерированием энергии или 2) включение в липиды (разд. 17.21). Следовательно, есть все основания думать, что активность пируват-дегидрогеназного комплекса должна строго регулироваться. И действительно, этот ферментный комплекс регулируется тремя путями.

1. *Ингибирование продуктами реакции.* Ацетил-СоА и NADH, продукты окисления пирувата, ингибируют ферментный комплекс. Ацетил-СоА подавляет активность трансацетилазного компонента, а NADH - активность дигидролипоил-дегидрогеназного компонента. Эти ингибиторные эффекты обращаются при действии соответственно СоА и NAD^+.

2. *Регуляция нуклеотидами по принципу обратной связи.* Активность ферментного комплекса регулируется *энергетическим зарядом* (разд. 11.13). Пируват-дегидрогеназный компонент специфически ингибируется GTP и активируется AMP. Следовательно, активность комплекса снижается, когда клетка богата легкодоступной энергией.

3. *Регуляция путем ковалентной модификации.* Комплекс теряет ферментативную активность, когда специфический остаток серина пируват-дегидрогеназного компонента фосфорилируется АТР. Фосфорилирование усиливается при высоких соотношениях ATP/ADP, ацетил-СоА/СоА, $NADH/NAD^+$ и ингибируется пируватом. Ферментный комплекс вновь активируется, если фосфорильная группа гидролизуется специфической фосфатазой. Дефосфорилирование усиливается при высоком содержании пирувата. *Ковалентная модификация представляет собою важный механизм регуляции ферментативной активности.* Мы вновь встретимся с регуляторной ролью реакций фосфорилирования и дефосфорилирования, когда будем рассматривать синтез и распад гликогена.

13.18. Регуляция цикла трикарбоновых кислот

Скорость функционирования цикла трикарбоновых кислот точно пригнана к потребности клеток в АТР. *Важной регуляторной реакцией цикла является синтез цитрата из оксалоацетата и ацетил-СоА.* АТР - аллостерический ингибитор цитрат-синтазы. Его действие заключается в повышении K_M для ацетил-СоА. Таким образом, с увеличением содержания АТР снижается насыщение фермента ацетил-СоА и в результате уменьшается образование цитрата.

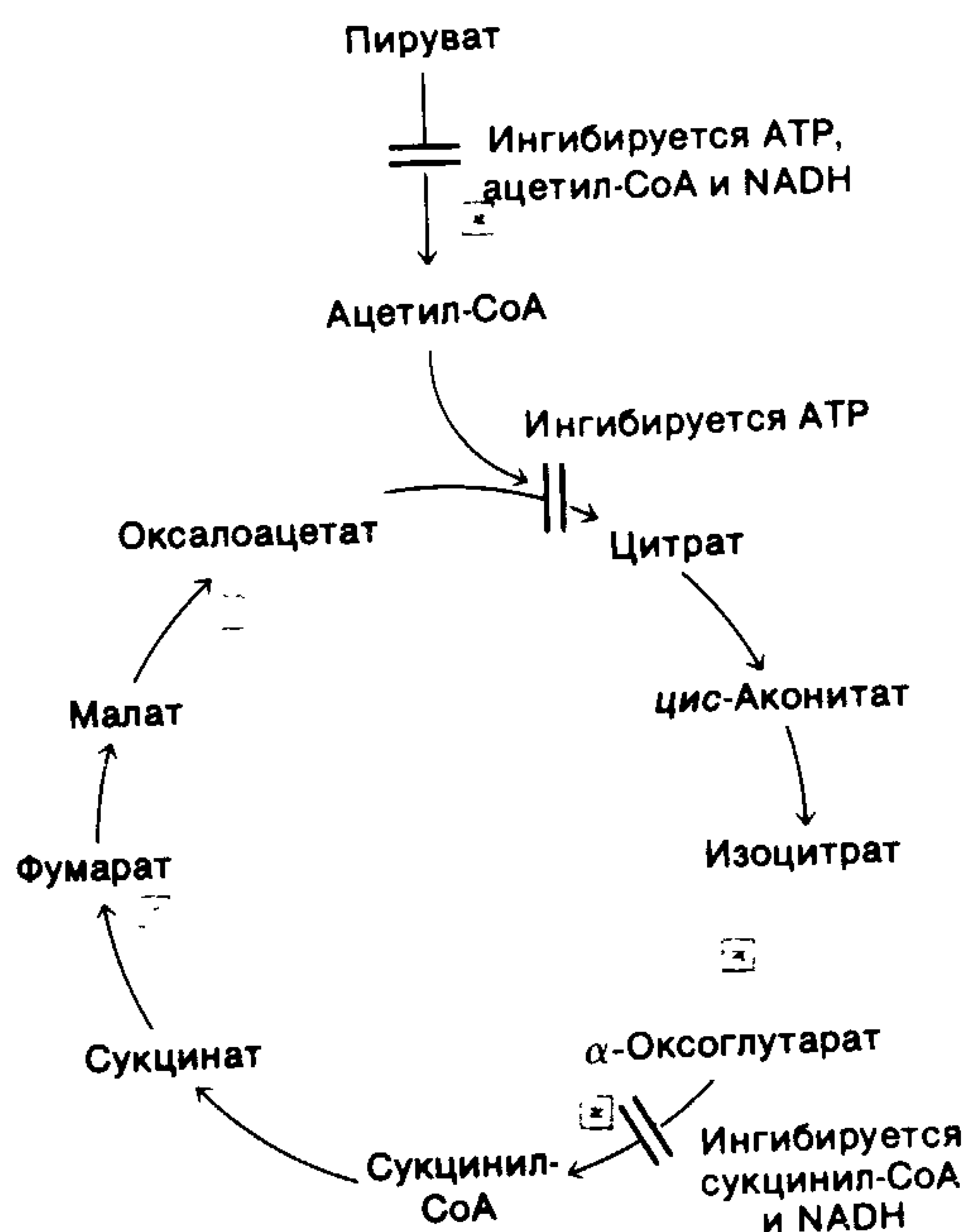


Рис. 13.16. Регуляция цикла трикарбоновых кислот и окислительного декарбоксилирования пирувата: звездочкой в квадрате указаны стадии, на которых требуется акцептор электронов (NAD^+ или FAD), регенерируемый в дыхательной цепи.

Вторая регуляторная реакция – это реакция, катализируемая изоцитрат-дегидрогеназой. Фермент аллостерически стимулируется ADP, который повышает его сродство к субстратам. Между связыванием изоцитрата, NAD^+, Mg^{2+} и ADP существует взаимная кооперативность. В отличие от этого NADH ингибирует изоцитрат-дегидрогеназу путем прямого вытеснения NAD^+.

Третьей регуляторной реакцией цикла трикарбоновых кислот является реакция, катализируемая α-оксоглутарат—дегидрогеназой. Регуляция на этом этапе в некоторых отношениях подобна регуляции на уровне пируват-дегидрогеназного комплекса, как и можно было ожидать, исходя из их структурной гомологии. α-Оксоглутарат-дегидрогеназа ингибируется сукцинил-CoA и NADH, т.е. продуктами катализируемой ею реакции. Она ингибируется также высоким энергетическим зарядом. *Коротко говоря, поступление двухуглеродных фрагментов в цикл трикарбоновых кислот и скорость цикла снижаются при высоком содержании АТР в клетке.* Эта регуляция достигается участием ряда комплементарных механизмов на различных стадиях цикла (рис. 13.16).

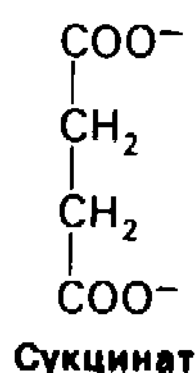
13.19. Открытие цикла Кребсом

«Меня часто спрашивали, как возникло и развивалось исследование цикла трикарбоновых кислот. Была ли эта концепция результатом внезапного вдохновения и предвидения?» «Ничего подобного,– отвечает Ганс Кребс (Hans Krebs),– это был очень медленный эволюционный процесс, развивавшийся в течение пяти лет начиная с 1932 г. (когда я включился в эту работу)...» Кребс вначале изучал скорость окисления различных соединений, используя срезы почек и печени. Он выбирал вещества, представлявшие собою возможные промежуточные продукты при окислении пищевых веществ. Кребс предполагал, что такие вещества будут быстро окисляться, а следовательно, их легко будет идентифицировать. Были получены важные данные: *цитрат*, сукцинат, фумарат и ацетат очень быстро окислялись в различных тканях.

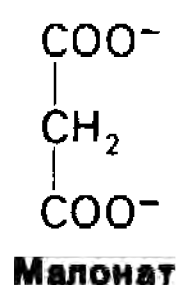
Существенный вклад в изучение этой проблемы внес Альберт Сент-Дьёрдьи (Albert Szent-Györgyi) в 1935 г. Он исследовал окисление различных веществ, используя суспензии измельченной грудной мышцы голубя. Эта очень активная летательная мышца обладает исключительно высокой скоростью окислительных процессов, что ускоряло ход эксперимента. Сент-Дьёрдьи обнаружил, что добавление некоторых C_4-дикарбоновых кислот повышало потребление O_2 в гораздо большей степени, чем это требовалось для их прямого окисления. Иными словами, они каталитически (а не стехиометрически) увеличивали потребление O_2. *Такая каталитическая стимуляция дыхания наблюдалась в присутствии сукцината, фумарата и малата.*

Следующим шагом вперед явилась расшифровка биологического пути окисления цитрата Карлом Мартиусом и Францем Кноопом (Carl Martius, Franz Knoop) в 1937 г. Они показали, что цитрат изомеризуется в изоцитрат через *цис*-аконитат и что изоцитрат подвергается окислительному де-

карбоксилированию в α-оксоглутарат. Возможность окисления α-оксоглутарата в сукцинат тогда уже была известна, и, *таким образом, это открытие позволило установить путь от цитрата до сукцината.* Оно подоспело в нужный момент, так как теперь Кребс смог объяснить свое недавнее наблюдение, что цитрат *каталитически усиливает* дыхание измельченной грудной мышцы голубя.



Сукцинат



Малонат

Дополнительная важная информация была получена в результате использования *малоната, специфического ингибитора сукцинат-дегидрогеназы.* Малонат является конкурентным ингибитором этого фермента, поскольку он структурно очень близок сукцинату. К этому времени было известно, что *малонат служит дыхательным ядом.* Кребс пришел к выводу, что сукцинат-дегидрогеназа может, таким образом, играть ключевую роль в дыхании. В пользу этого предположения говорил тот факт, что при добавлении цитрата к мышце, отравленной малонатом, в ней накапливается сукцинат. Более того, накопление сукцината в такой мышце происходило также при добавлении фумарата. Первый из этих экспериментов указывает на физиологическую значимость пути от цитрата до сукцината. Второй эксперимент раскрывает существование пути от фумарата до сукцината, отличающегося от реакции, катализируемой сукцинат-дегидрогеназой.

Кребс установил далее, что цитрат быстро образуется в мышечной суспензии при добавлении оксалоацетата. *Открытие синтеза цитрата из оксалоацетата позволило Кребсу построить полную схему процесса.* Постулированный им цикл трикарбоновых кислот сразу создал ясную картину окисления углеводов. В этой картине нашли свое точное место многие экспериментальные факты – такие, например, как каталитическое усиление дыхания сукцинатом и другими промежуточными подуктами. Примечательно, что цикл трикарбоновых кислот – не единственный и не первый метаболический цикл, раскрытый Кребсом. Шестью годами ранее он показал, что мочевина превращается по циклическому метаболическому пути, названному орнитиновым циклом (гл. 18). Таким образом, концепция циклического метаболического пути уже была полностью осознана Кребсом, когда он анализировал данные и определял ход экспериментов, которые привели к предложенному им циклу трикарбоновых кислот.

Заключение

Цикл трикарбоновых кислот представляет собою конечный общий путь для окисления топливных молекул. Он служит также источником строительных блоков для процессов биосинтеза. Большинство топливных молекул вступают в цикл в виде ацетил-СоА. Окислительное декарбоксилирование пирувата, приводящее к образованию ацетил-СоА, является связующим звеном между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот. Эта реакция и все реакции цикла протекают в митохондриях в отличие от гликолиза, который происходит в цитозоле. Цикл начинается с конденсации оксалоацетата (C_4) и ацетил-СоА (C_2) с образованием цитрата (C_6), который изомеризуется в изоцитрат (C_6). Окислительное декарбоксилирование изоцитрата дает α-оксоглутарат (C_5). Вторая молекула CO_2 выделяется в следующей реакции, в которой α-оксоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию в сукцинил-СоА (C_4). Тиоэфирная связь сукцинил-СоА в присутствии P_i расщепляется с образованием сукцината и одновременным генерированием высокоэнергетической фосфатной связи в форме GTP или АТР. Сукцинат окисляется в фумарат (C_4), который затем гидратируется в малат (C_4). Наконец, малат окисляется, приводя к регенерированию оксалоацетата (C_4). Таким образом, два атома углерода поступают в цикл в виде ацетил-СоА и два атома углерода покидают цикл в виде CO_2 при последовательных реакциях декарбоксилирования, катализируемых

изоцитрат-дегидрогеназой и α-оксоглутарат—дегидрогеназой. В четырех окислительно-восстановительных реакциях цикла три пары электронов переносятся на NAD^+ и одна пара – на FAD. Эти восстановленные переносчики электронов окисляются затем в цепи переноса электронов, что сопровождается генерированием одиннадцати молекул АТР. Кроме того, одна высокоэнергетическая фосфатная связь образуется непосредственно в цикле трикарбоновых кислот. Следовательно, на каждый двухуглеродный фрагмент, который полностью окисляется до H_2O и CO_2, происходит генерирование двенадцати высокоэнергетических фосфатных связей.

Цикл трикарбоновых кислот функционирует только в аэробных условиях, поскольку для него необходимо поступление NAD^+ и FAD. Эти переносчики электронов регенерируют при переносе электронов NADH и $FADH_2$ на O_2 по электрон-транспортной цепи, сопровождающемся одновременным образованием АТР. Следовательно, скорость цикла трикарбоновых кислот зависит от потребности в АТР. Важное значение в этом отношении имеет также регуляция трех ферментов цикла. Высокий энергетический заряд понижает активность цитрат-синтазы, изоцитрат-дегидрогеназы и α-оксоглутарат—дегидрогеназы. Еще один важный регуляторный пункт – необратимое образование ацетил-СоА из пирувата. Активность пируват-дегидрогеназного комплекса контролируется путем 1) ингибирования продуктами реакции, 2) регуляции нуклеотидами по принципу обратной связи и 3) ковалентной модификации. Эти механизмы дополняют друг друга в снижении скорости образования ацетил-СоА при высоком энергетическом заряде клетки.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Книги и общие обзоры

Lowenstein J. M. (ed.), 1969. Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation, Marcel Dekker.

Goodwin T. W. (ed.), 1968. The Metabolic Roles of Citrate, Academic Press.

Lowenstein J. M., 1971. The pyruvate dehydrogenase complex and the citric acid cycle, Compr. Biochem., **18S**, 1–55.

Механизмы реакции и стереоспецифичность

Popják G., 1970. Stereospecificity of enzymic reactions. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 2, pp. 115–215, Academic Press. (Прекрасный обзор, содержащий обсуждение стереохимии цикла трикарбоновых кислот.)

Ogston A. G., 1948. Interpretation of experiments on metabolic processes using isotopic tracer elements, Nature, **162**, 963.

Hirschmann H., 1960. The nature of substrate asymmetry in stereoselective reactions, J. Biol. Chem., **235**, 2762–2767.

Bentley R., 1969. Molecular Asymmetry in Biology, vols. 1 and 2, Academic Press. (Эти тома содержат богатую информацию о стереоспецифичности в биохимических реакциях. В гл. 2 тома 1 обсуждается номенклатура, в гл. 4 – прохиральность.)

Фторцитрат и аконитаза

Peters R., 1954. Biochemical light upon an ancient poison: a lethal synthesis, Endeavor, **13**, 147–154. (Рассматривается превращение фторацетата во фторцитрат, ингибитор аконитазы.)

Gribble G. W., 1973. Fluoroacetate toxicity, J. Chem. Ed., **50**, 460–462.

Glusker J. P., 1971. Aconitase. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 5, pp. 413–439.

Пируват- и α-оксоглутарат—дигидрогеназные комплексы

Reed L. J., 1974. Multienzyme complexes, Acc. Chem. Res., **7**, 40–46.

Bates D. L., Danson M. J., Hale G., Hooper E. A., Perham R. N., 1977. Self-assembly and catalytic activity of the pyrivate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*, Nature, **268**, 313–316.

Collins J. H., Reed L. J., 1977. Acyl group and electron pair relay system: a network of interacting lipoyl moieties in the pyruvate and α-ketoglutarate dehydrogenase complexes from *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 4223–4227.

Gutowski J. A., Lienhard G. E., 1976. Transition state analogs for thiamine pyrophosphate-dependent enzymes, J. Biol. Chem., **251**, 2863–2866.

Randle P. J., 1978. Pyruvate dehydrogenase complex: meticulous regulator of glucose disposal in animals, Trends Biochem. Sci., **3**, 217–219.

DeRosier D. J., Oliver R. M., 1971. A low resolution electron density map of lipoyl transsuccinylase, the core of the α-ketoglutarate dehydrogenase complex, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **36**, 199–203.

Открытие цикла трикарбоновых кислот

Krebs H. A., Johnson W. A., 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues, Enzymologia, **4**, 148–156.

Krebs H. A., 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle, Perspect. Biol. Med., **14**, 154–170.

ПРИЛОЖЕНИЕ

RS-обозначение хиральности

Абсолютную конфигурацию любого хирального центра можно однозначно квалифицировать, используя *RS*-обозначения, введенные в 1956 г. Робертом Каном, Кристофером Ингольдом и Владимиром Прелогом (Robert Cahn, Christopher Ingold, Vladimir Prelog). Рассмотрим это на примере хирального соединения CHFClBr (рис. 13.17, *А*). При использовании *RS*-обозначений вначале (первый этап) определяют *приоритетную последовательность* для четырех заместителей, принимая, что *атом с более высоким атомным номером имеет приоритет перед атомом с более низким атомным номером*. Отсюда рассматриваемые нами четыре заместителя имеют следующую приоритетную последовательность: *а*–Br, *б*–Cl, *в*–F и *г*–H, с наивысшим приоритетом для Br (*а*). Затем (второй этап) *ориентируют молекулу таким образом, чтобы группа с самым низким приоритетом (г) находилась в точке, удаленной от наблюдателя*. Для CHFClBr это означает, что молекула должна быть ориентирована так, чтобы H было от нас удалено (находилось за плоскостью страницы на рис. 13.17, *Б*). И наконец (последний этап), *выясняют, направлен ли путь от а до б и от б до в при данных условиях по часовой стрелке или против часовой стрелки*. Если он идет по часовой стрелке (вправо), конфигурация обозначается буквой *R* (от лат. rectus, правый), если против часовой стрелки, то

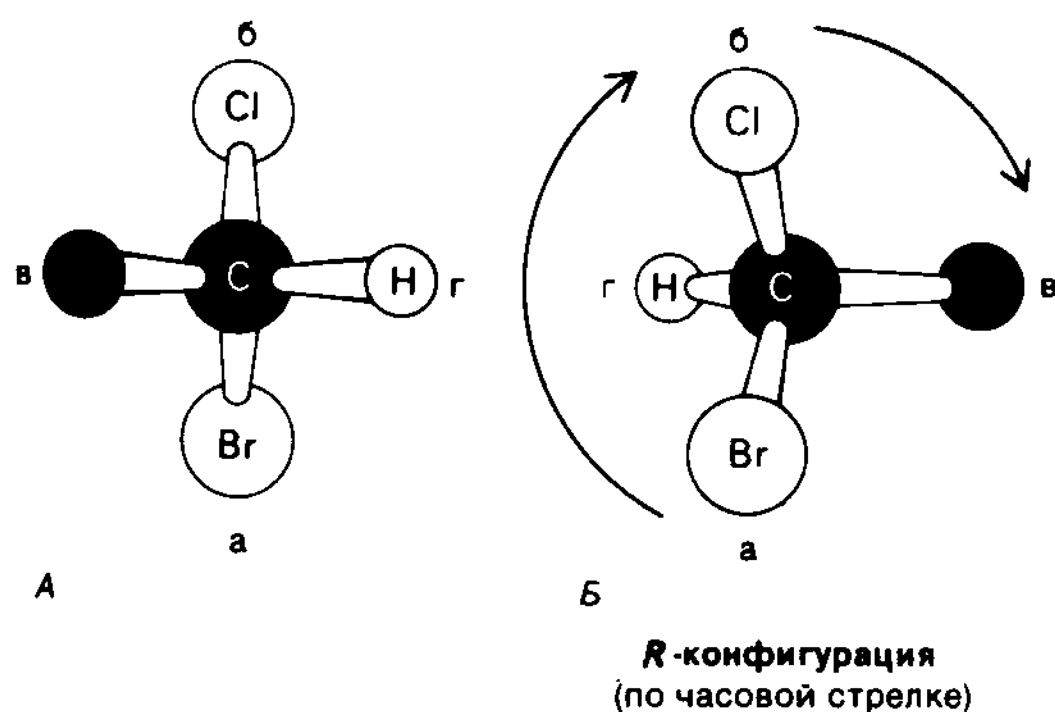


Рис. 13.17. Показанный здесь стереоизомер CHFClBr имеет *R*-конфигурацию.

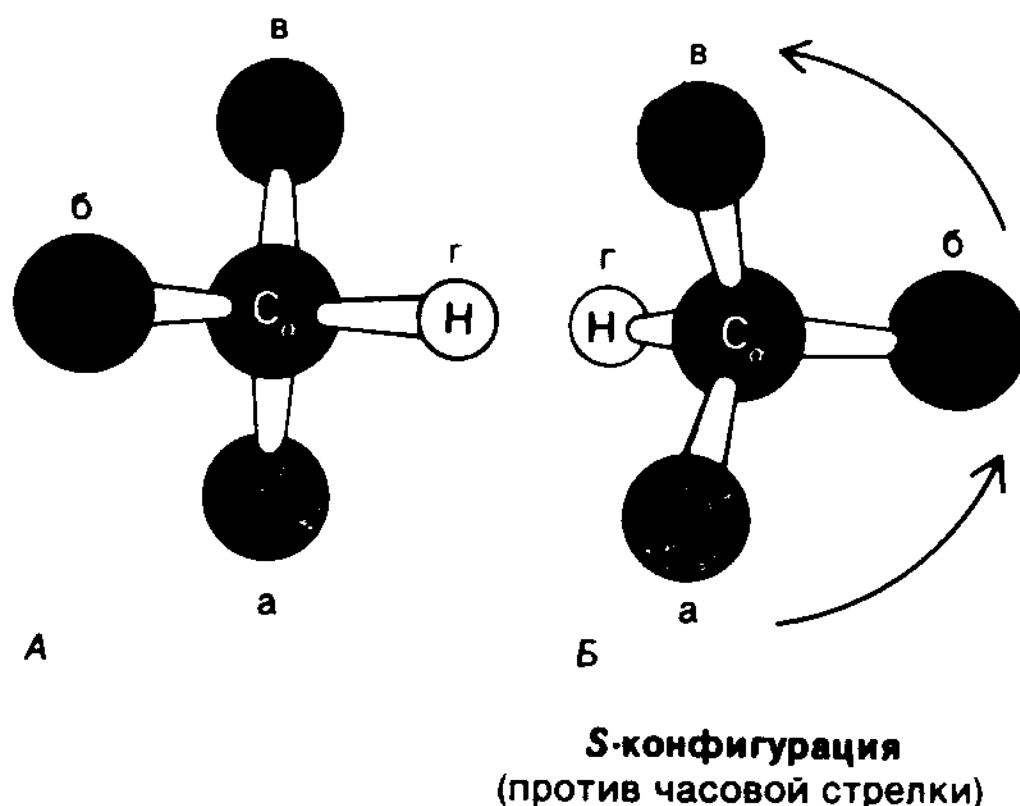


Рис. 13.18. L-аланин имеет *S*-конфигурацию.

конфигурация обозначается как *S* (от лат. sinister, левый). Конфигурация стереоизомера CHFClBr, показанного на рис. 13.17, представляет собою *R*-конфигурацию.

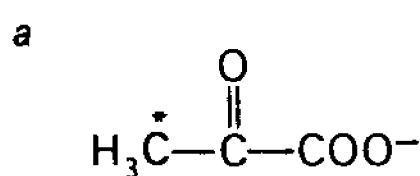
Теперь рассмотрим *RS*-обозначение для аланина (рис. 13.18, *А*). Четыре атома, связанные с α-углеродом,– это N, C, C и H. Приоритетную последовательность метильного углерода и карбоксильного углерода определяют переходом по направлению наружу, к следующей совокупности атомов. *Имеет смысл указать приоритетную последовательность для биохимически важных групп*: —SH (наивысший приоритет), —OR, —OH, —NHR, $—NH_2$, —COOR, —COOH, —CHO, $—CH_2OH$, $—C_6H_5$, $—CH_3$, —T, —D, —H (самый низкий приоритет).

Таким образом, приоритетная последовательность четырех групп, связанных с α-углеродным атомом аланина, следующая: *а* $—NH_3^+$, *б* $—COO^-$, *в* $—CH_3$ и *г* —H. Затем ориентируют β-аланин таким образом, чтобы группа с самым низким приоритетом (—H) оказалась за плоскостью страницы (рис. 13.18, *Б*). Путь от *а* $—NH_3^+$ к *б* $—COO^-$ и *в* $—CH_3$ пойдет тогда против часовой стрелки (влево), из чего следует, что L-аланин имеет *S*-конфигурацию.

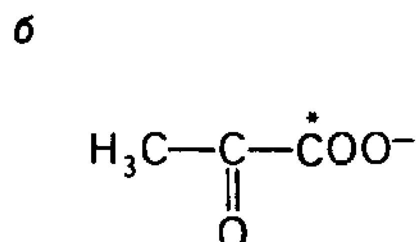
Вопросы и задачи

1. Какова будет судьба радиоактивной метки, если каждое из следующих соединений добавить к клеточному экстракту, содержащему ферменты и кофакторы гликолитического пути и цикла трикарбоновых кислот, а также пируват-дегидрогеназный комплекс? (Метка ^{14}C обозначена звездочкой.)

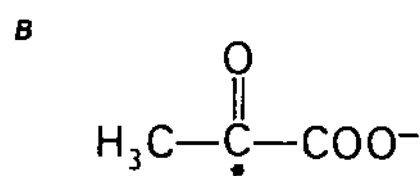
а



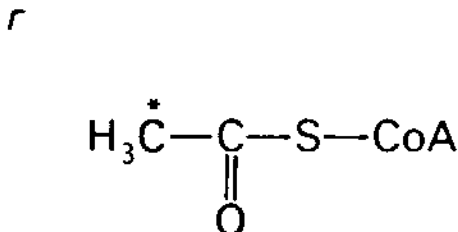
б



в



г



д. Глюкозо-6-фосфат, меченный по С-1.

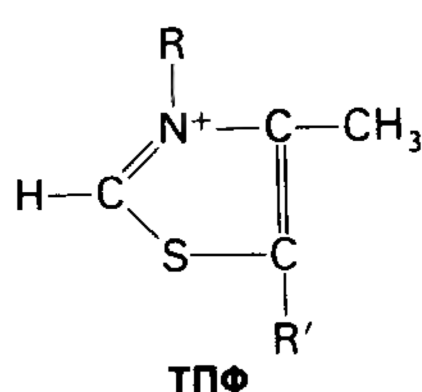
2. Будет ли происходить *накопление* оксалоацетата, если к экстракту, содержащему ферменты и кофакторы цикла трикарбоновых кислот, добавить ацетил-СоА?

3. Каковы относительные концентрации цитрата, изоцитрата и *цис*-аконитата в состоянии равновесия? (Используйте данные табл. 13.1.)

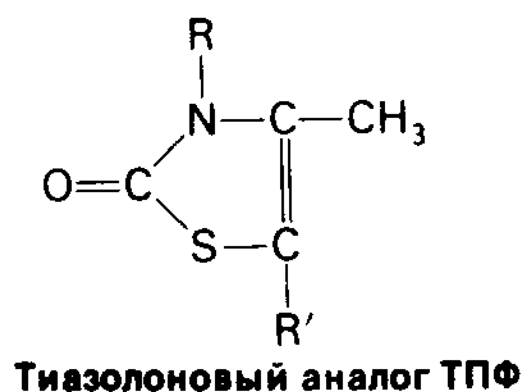
4. Каково значение $\Delta G^{0\prime}$ для окисления ацетильного компонента ацетил-СоА в цикле трикарбоновых кислот?

5. Инкубируя $H_3C—CD_2—OH$ и NAD^+ с алкоголь-дегидрогеназой, получили препарат дейтерированного восстановленного NAD. Этот восстановленный кофермент добавили к раствору 1,3-БФГ и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы. NAD^+, образовавшийся при этой второй реакции, содержит один атом дейтерия, в то время как в молекуле глицеральдегид-3-фосфата, другого продукта реакции, дейтерия нет. Какой вывод о стереоспецифичности глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы можно сделать из этого эксперимента?

6. Тиаминтиазолонпирофосфат связывается с пируват-дегидрогеназой примерно в 20 000 раз сильнее, чем тиаминпирофосфат, и конкурентно ингибирует этот фермент. Почему?



ТПФ



Тиазолоновый аналог ТПФ

7. Окисление за счет NAD^+ малата с образованием оксалоацетата является при стандартных условиях высокоэндергонической реакцией ($\Delta G^{0\prime} = + 7$ ккал/моль). При физиологических условиях реакция легко идет в направлении от малата к оксалоацетату, потому что равновесные концентрации продуктов реакции малы по сравнению с концентрациями субстратов. Приняв, что отношение $[NAD^+]/[NADH] = 8$ и pH 7, вычислите минимальное отношение [Малат]/[Оксалоацетат], при котором может происходить образование оксалоацетата из малата.

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benlow R. M., Hood L. E., Biochemistry: a problem approach (Benjamin, 1974), гл. 10.

ГЛАВА 14

Окислительное фосфорилирование



Рис. 14.1. Электронная микрофотография митохондрии. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

NADH и $FADH_2$, образовавшиеся при гликолизе, окислении жирных кислот и в цикле трикарбоновых кислот, представляют собою богатые энергией молекулы, поскольку каждая из них содержит пару электронов с высоким потенциалом переноса. При переносе этих электронов на молекулярный кислород высвобождается большое количество энергии. Высвободившаяся энергия может быть использована для генерирования АТР. *Окислительное фосфорилирование – это процесс образования АТР, сопряженного с транспортом электронов по цепи переносчиков от NADH или $FADH_2$ к O_2.* У аэробных организмов этот процесс служит главным источником АТР. Так, окислительное фосфорилирование обеспечивает генерирование 32 молекул АТР из 36, образующихся в процессе полного окисления глюкозы до CO_2 и H_2O. Наиболее характерные черты этого процесса сводятся к следующему.

Дыхание – процесс генерирования АТР, в котором роль конечного акцептора электронов выполняет неорганическое соединение (такое, как O_2). Донором электронов может служить как органическое, так и неорганическое соединение.

1. Окислительное фосфорилирование осуществляется *дыхательными ансамблями*, локализованными *во внутренней мембране митохондрий*. Цикл трикарбоновых кислот и путь окисления жирных кислот, поставляющие большую часть NADH и $FADH_2$, осуществляются в прилежащем митохондриальном матриксе.

2. Окисление NADH дает 3 АТР, тогда как окисление $FADH_2$ дает 2 АТР. Окисление и фосфорилирование – процессы сопряженные.

3. Дыхательные ансамбли включают в себя многочисленные переносчики электронов, в частности цитохромы. Многоступенчатый транспорт электронов от NADH или $FADH_2$ к O_2 по цепи этих переносчиков приводит к выбросу протонов из митохондриального матрикса и генерированию мембранного потенциала (протонодвижущей силы). Протоны перекачиваются тремя видами электронпереносящих комплексов. В процессе обратного тока протонов в митохондриальный матрикс при посредстве

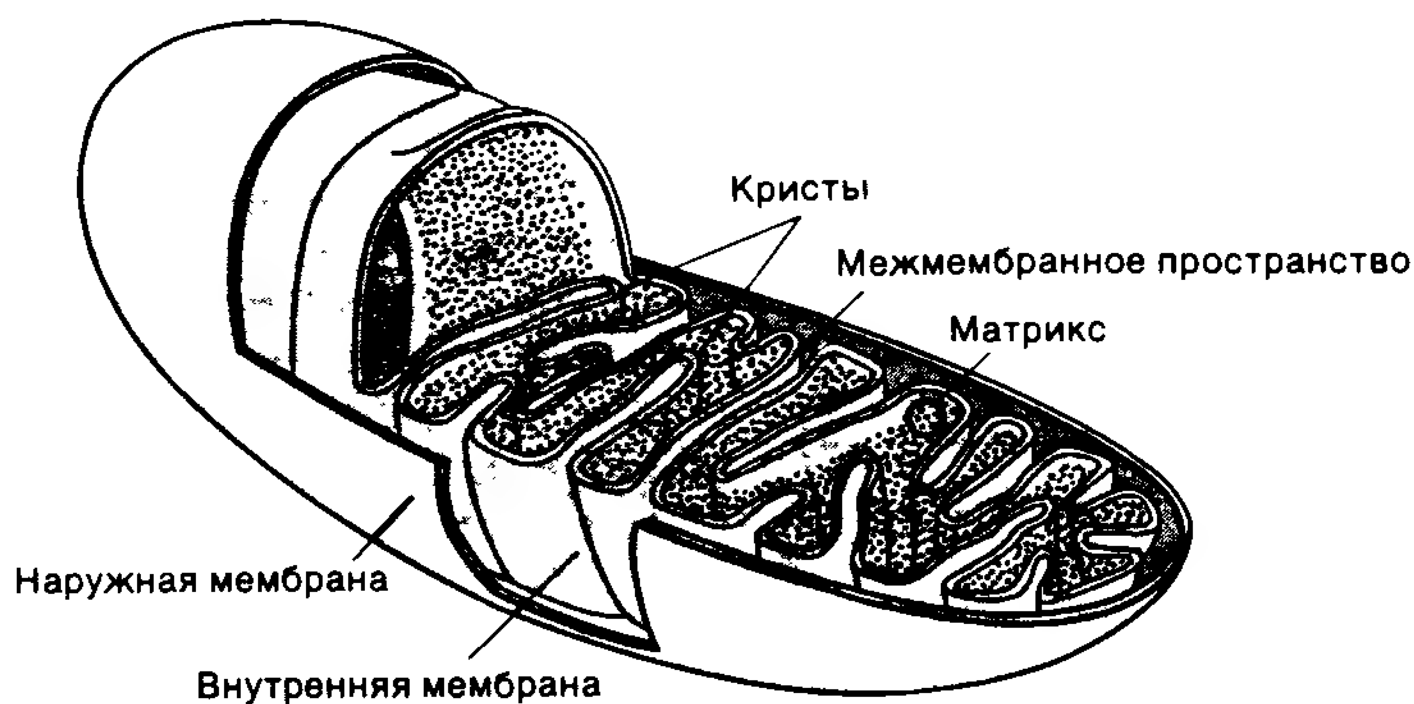


Рис. 14.2. Схематическое изображение митохондрий. (Wolfe Stephen L., Biology of the Cell, Wadsworth Publishing Company, 1972.)

ферментного комплекса происходит синтез ATP. Таким образом, сопряжение *окисления и фосфорилирования обеспечивается протонным градиентом через внутреннюю митохондриальную мембрану.*

14.1. Окислительное фосфорилирование происходит в митохондриях

Митохондрии представляют собою органеллы овальной формы длиной обычно около 2 мкм и диаметром 0,5 мкм. Метод выделения митохондрий был разработан в конце 40-х годов. Юджин Кеннеди и Элберт Ленинджер (Eugene Kennedy, Albert Lehninger) открыли тогда *присутствие в митохондриях дыхательных ансамблей, ферментов цикла трикарбоновых кислот и ферментов окисления жирных кислот.* Электронно-микроскопические исследования выполненные Георгом Паладом и Фритьофом Сьёстрандом (George Palade, Fritjof Sjöstrand), показали, что митохондрии имеют две мембранные системы: *наружную мембрану* и имеющую большую поверхность *внутреннюю мембрану.* Последняя образует многочисленные глубокие складки (гребневидные выросты), называемые *кристами.* Таким образом, в митохондриях имеются два компартмента: *межмембранное пространство* (между наружной и внутренней мембранами) и *матрикс*, ограниченный внутренней мембраной (рис. 14.2). *Дыхательные ансамбли составляют неотъемлемую часть внутренней митохондриальной мембраны*, тогда как бóльшая часть реакций цикла трикарбоновых кислот и окисления жирных кислот протекает в матриксе.

Наружная мембрана вполне проницаема для большинства мелких молекул и ионов. В противоположность этому внутренняя мембрана проницаема почти для всех ионов и для большинства незаряженных молекул. Существуют специальные белковые переносчики, транспортирующие через внутреннюю митохондриальную мембрану такие молекулы, как ATP и жирные кислоты с длинной цепью.

14.2. Окислительно-восстановительные потенциалы и изменения свободной энергии

При окислительном фосфорилировании *потенциал переноса электронов*, присущий NADH или $FADH_2$, преобразуется в *потенциал переноса фосфатной группы*, присущий ATP. Для этих форм свободной энергии надо найти количественное выражение. Измерение потенциала переноса фосфатной группы нам уже знакомо: оно выводится из $\Delta G^{0'}$ для гидролиза фосфатного соединения. Соответствующим выражением для потенциала переноса электронов является E_0', окислительно-восстановительный потенциал (называемый также редокс-потенциалом).

Окислительно-восстановительный потенциал – это электрохимическая категория. Рассмотрим для примера вещество, которое может существовать в окисленной X и в восстановленной форме X^-. Такая пара называется *окислительно-восстановительной парой* (рис. 14.3). Окислительно-восстановительный потенциал такой пары можно определить, измеряя электродвижущую силу, развиваемую опытной *полукамерой* по отношению к *стандартной контрольной полукамере.* Опытная полукамера представляет собою электрод, погруженный в раствор

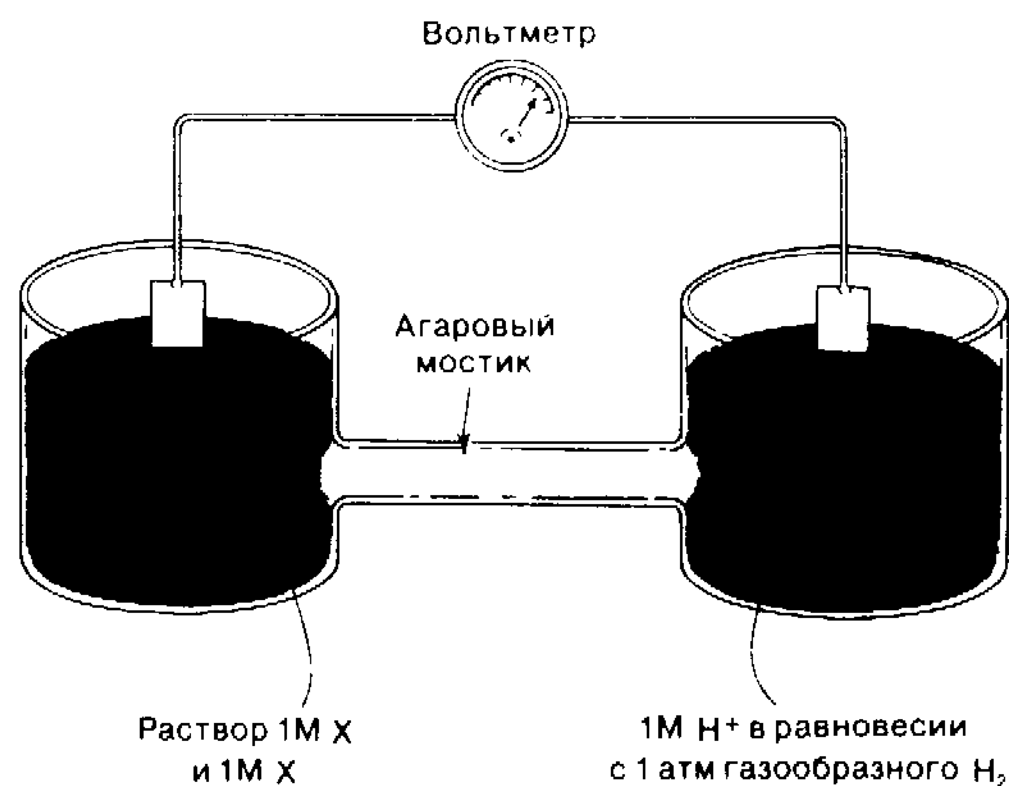


Рис. 14.3. Устройство для измерения стандартного окислительно-восстановительного потенциала окислительно-восстановительной пары.

1 М окислителя (X) и 1 М восстановителя (X^-). Стандартная контрольная полукамера состоит из электрода, погруженного в 1 М раствор H^+, находящийся в равновесии с газообразным H_2 при давлении в 1 атм. Электроды присоединяют к вольтметру и агаровым мостиком обеспечивают электропроводность между полукамерами. Происходит поток электронов от одной полукамеры к другой. Если реакция идет в направлении

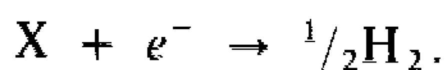


$$X^- + H^+ \rightarrow X + {}^1/_2H_2,$$

то в полукамерах будут происходить следующие реакции:



$$X^- \rightarrow X + e^-,$$



$$X + e^- \rightarrow {}^1/_2H_2.$$

Таким образом, электроны движутся от опытной полукамеры к контрольной и, следовательно, электрод в опытной полукамере заряжен отрицательно по отношению к электроду стандартной полукамеры. *Окислительно-восстановительный потенциал пары $X : X^-$ соответствует напряжению в начале эксперимента* (когда концентрации X, X^- и H^+ равны 1 М). *Окислительно-восстановительный потенциал пары $H^+ : H_2$ определен равным 0 В (вольт).*

Значение окислительно-восстановительного потенциала теперь очевидно. Отрицательный окислительно-восстановительный потенциал говорит о том, что данное вещество имеет меньшее сродство к электронам, чем H_2 (как в вышеприведенном примере). Положительный окислительно-восстановительный потенциал свидетельствует о более высоком, чем у H_2, сродстве данного вещества к электронам. Эти соотношения относятся к стандартным условиям, когда концентрации окислителя, восстановителя и H^+ равны 1 М и давление H_2 составляет 1 атм. Таким образом, *сильный восстановитель (например, NADH) обладает отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом, тогда как сильный окислитель (O_2) имеет положительный окислительно-восстановительный потенциал.*

Окислительно-восстановительные потенциалы многих биологически важных окислительно-восстановительных пар известны (табл. 14.1). Изменение свободной энергии окислительно-восстановительной реакции

Таблица 14.1. **Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы некоторых реакций**[1)]

Окислитель	Восстановитель	n	E_0', В
α-Оксоглутарат	Сукцинат + CO_2	2	– 0,67
Ацетат	Ацетальдегид	2	– 0,60
Ферредоксин (окисленный)	Ферредоксин (восстановленный)	1	– 0,43
$2H^+$	H_2	2	0,42
NAD^+	NADH + H^+	2	– 0,32
$NADP^+$	NADPH + H^+	2	0,32
Липоат (окисленный)	Липоат (восстановленный)	2	– 0,29
Глутатион (окисленный)	Глутатион (восстановленный)	2	– 0,23
Ацетальдегид	Этанол	2	– 0,20
Пируват	Лактат	2	– 0,19
Фумарат	Сукцинат	2	0,03
Цитохром *b* (+ 3)	Цитохром *b* (+ 2)	1	0,07
Дегидроаскорбат	Аскорбат	2	0,08
Убихинон (окисленный)	Убихинон (восстановленный)	2	0,10
Цитохром *c* (+ 3)	Цитохром *c* (+ 2)	1	0,22
Fe (+ 3)	Fe (+ 2)	1	0,77
1/2 O_2 + $2H^+$	H_2O	2	0,82

1) E_0' стандартный окислительно-восстановительный потенциал (pH7, 25°С), *n* количество транспортируемых электронов. E_0' относится к частичной реакции Окислитель + e^- → Восстановитель.

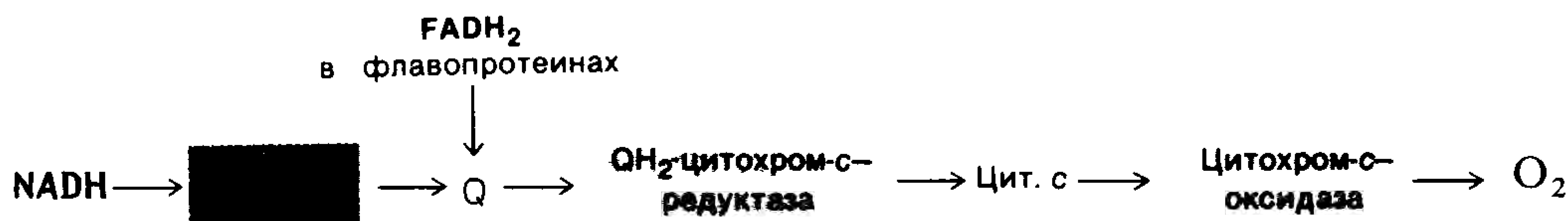


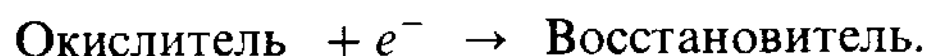
Рис. 14.4. Последовательность переносчиков электронов в дыхательном ансамбле. Протоны выбрасываются тремя комплексами, которые на рисунке закрашены.

можно легко вычислить из разности окислительно-восстановительных потенциалов реагирующих соединений. Рассмотрим, например, восстановление пирувата за счет NADH:



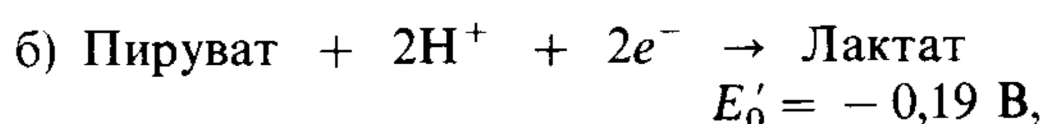
а) Пируват + NADH + H^+ ⇌ ⇌ Лактат + NAD^+.

Окислительно-восстановительный потенциал для пары NAD^+ : NADH равен − 0,32 В, для пары пируват : лактат − 0,19 В. Условимся окислительно-восстановительные потенциалы, относящиеся к частичным реакциям, записывать следующим образом:

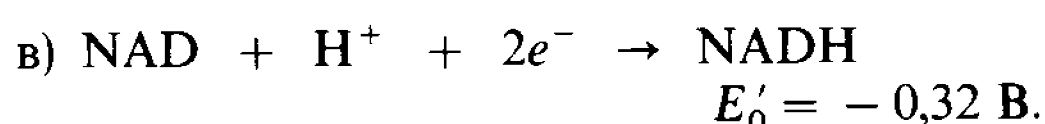


Окислитель $+ e^- \rightarrow$ Восстановитель.

Тогда



б) Пируват + $2H^+$ + $2e^-$ → Лактат $E_0' = -0{,}19$ В,



в) NAD + H^+ + $2e^-$ → NADH $E_0' = -0{,}32$ В.

Вычитая реакцию в) из реакции б), получаем желаемую реакцию а) и $\Delta E_0' = +0{,}13$ В. Теперь можем рассчитать $\Delta G^{0\prime}$ для восстановления пирувата за счет NADH. Изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^{0\prime}$ связано с изменением окислительно-восстановительного потенциала $\Delta E_0'$ уравнением

$$\Delta G^{0\prime} = -nF\Delta E_0',$$

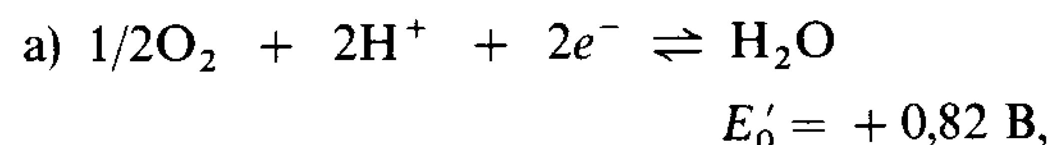
где n – число переносимых электронов, F – число Фарадея (23,062 ккал · $В^{-1}$ · $моль^{-1}$), $\Delta E_0'$ выражается в вольтах, $\Delta G^{0\prime}$ – в килокалориях на моль. Для восстановления пирувата $n = 2$, и тогда

$$\Delta G^{0\prime} = -2 \cdot 23{,}062 \cdot 0{,}13 = -6 \text{ ккал/моль}.$$

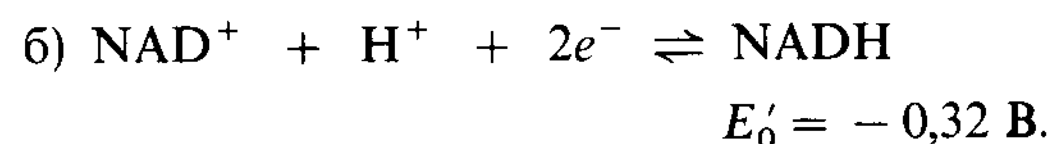
Заметим, что *положительное значение $\Delta E_0'$ указывает на экзергонический характер реакции*, протекающей в стандартных условиях.

14.3. Величина окислительно-восстановительного потенциала дыхательной цепи составляет 1,14 В, что соответствует 53 ккал

Движущая сила окислительно фосфорилирования – это потенциал переноса электронов, присущий NADH или $FADH_2$. Рассчитаем $\Delta E_0'$ и $\Delta G^{0\prime}$, связанные с окислением NADH под действием O_2. Промежуточные частичные реакции следующие:

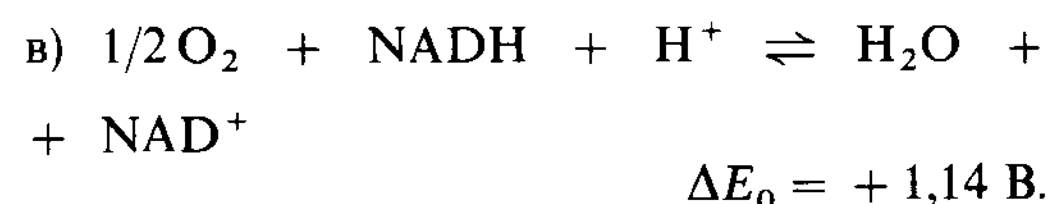


а) $1/2O_2$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⇌ H_2O $E_0' = +0{,}82$ В,



б) NAD^+ + H^+ + $2e^-$ ⇌ NADH $E_0' = -0{,}32$ В.

Вычитая реакцию б) из реакции а), получаем



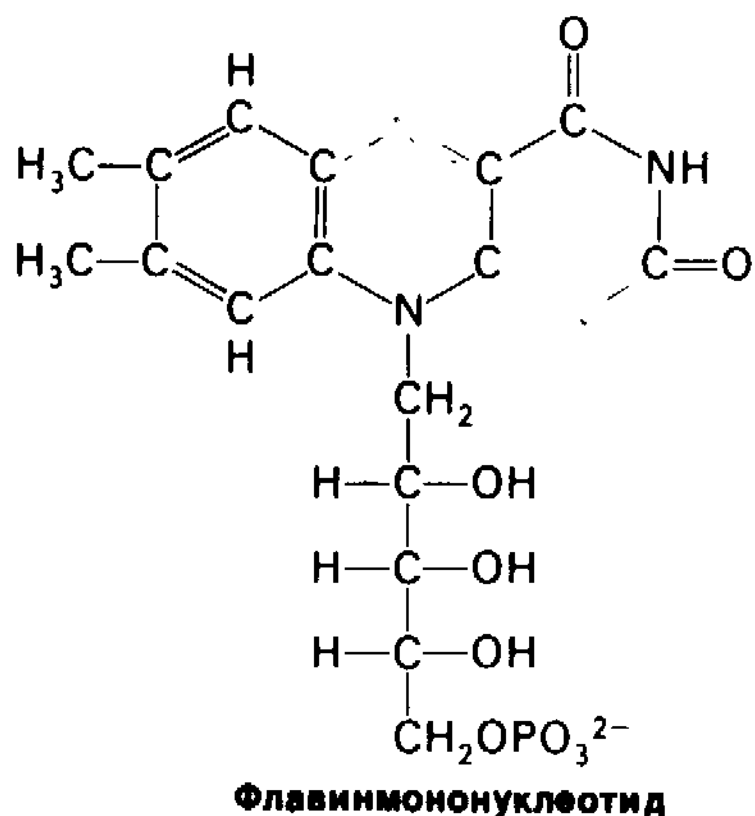
в) $1/2O_2$ + NADH + H^+ ⇌ H_2O + + NAD^+ $\Delta E_0 = +1{,}14$ В.

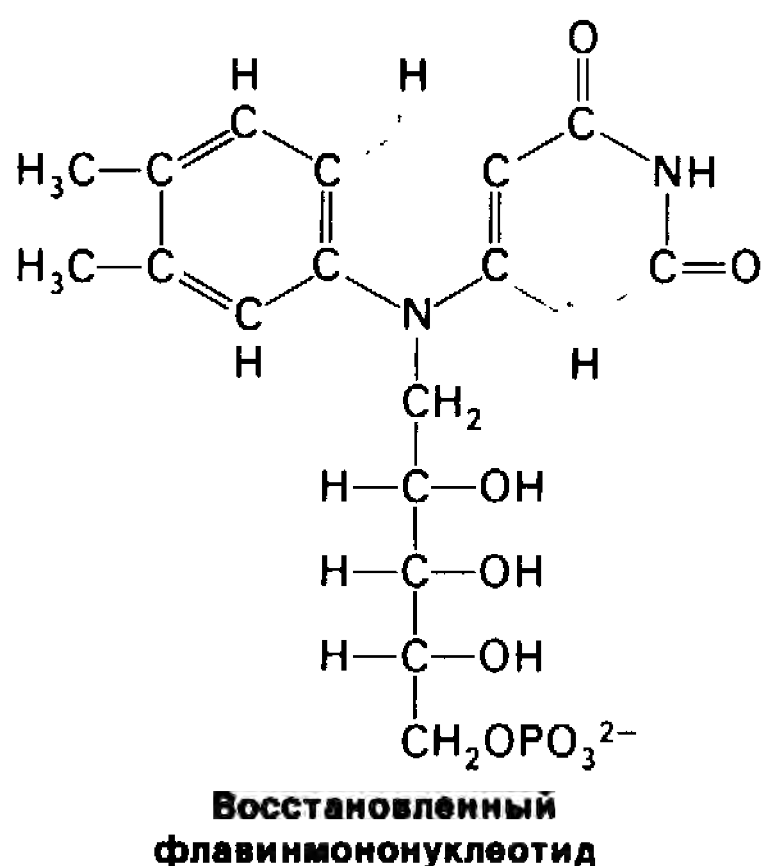
Свободная энергия окисления для этой реакции составляет

$$\Delta G^{0\prime} = nF\Delta E_0' = -2 \cdot 23{,}062 \cdot 1{,}14 = -52{,}6 \text{ ккал/моль}.$$

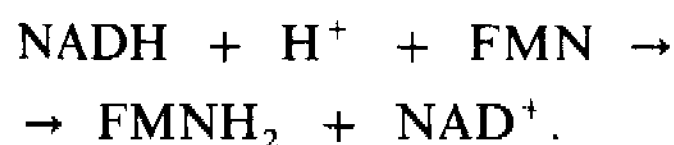
14.4. Флавин, железо-серные комплексы, хинон и гемовые группы переносят электроны от NADH к O_2

Электроны переносятся от NADH к O_2 через ряд переносчиков: флавины, железо-серные комплексы, хиноны и гемы (рис. 14.4). Эти переносчики электронов, за исключением хинонов, являются простетическими группами белков. Первая реакция состоит в окислении NADH под действием *NADH-Q-редуктазы* (называемой также *NADH-дегидрогеназой*), ферментом, состоя-


Флавинмононуклеотид


Восстановленный флавинмононуклеотид

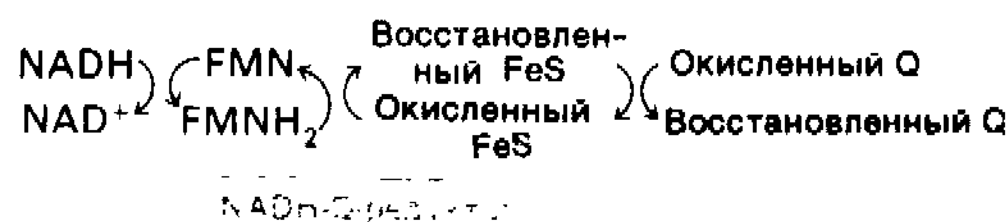
щим по меньшей мере из шестнадцати полипептидных цепей. Два электрона переносятся от NADH на *флавинмононуклеотид* (FMN), простетическую группу фермента, с образованием ее восстановленной формы $FMNH_2$



$$NADH + H^+ + FMN \rightarrow$$
$$\rightarrow FMNH_2 + NAD^+.$$

С $FMNH_2$ электроны переносятся затем на ряд *железо-серных комплексов* (сокращенно Fe-S), играющих роль второй простетической группы в молекуле NADH-Q-редуктазы. Железо в этих соединениях - это негемовое железо, в связи с чем железо-серные белки называют также *негемовыми железопротеинами*. Новые исследования показали, что Fe-S-комплексы играют важную роль в широком круге окислительно-восстановительных реакций в биологических системах. Известны три вида Fe-S-центров (рис. 14.5). В простейшем случае единственный атом железа тетраэдрически координирован с сульфгидрильными группами четырех цистеиновых остатков белка. Второй вид комплексов (обозначен как Fe_2-S_2) содержит 2 атома железа и два неорганических дисульфида, присоединенных к четырем цистеиновым остаткам. В комплексах третьего вида (Fe_4-S_4) содержится четыре атома железа, четыре неорганических сульфида и четыре остатка цистеина. Атом железа в этих комплексах может присутствовать в восстановленном (Fe^{2+}) или окисленном (Fe^{3+}) состоянии. NADH-Q-редуктаза содержит второй (Fe_2-S_2) и третий (Fe_4-S_4) типы комплексов.

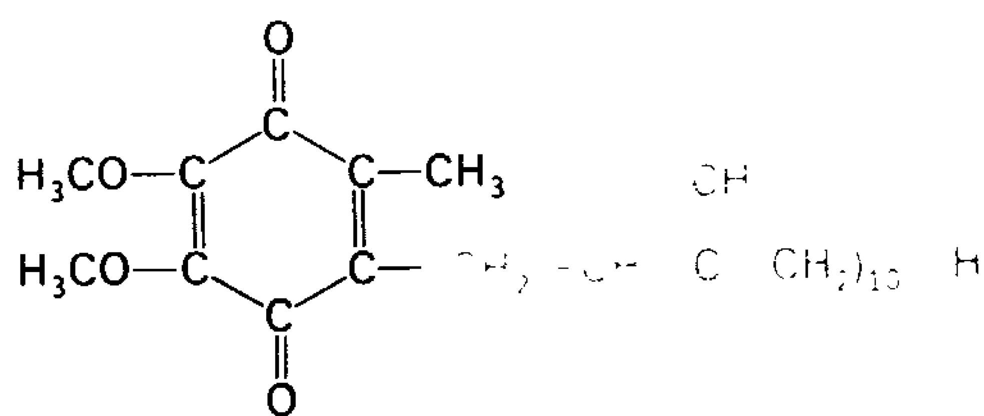
От железо-серных центров NADH-Q-редуктазы электроны переносятся далее на *кофермент Q* (сокращенно Q).



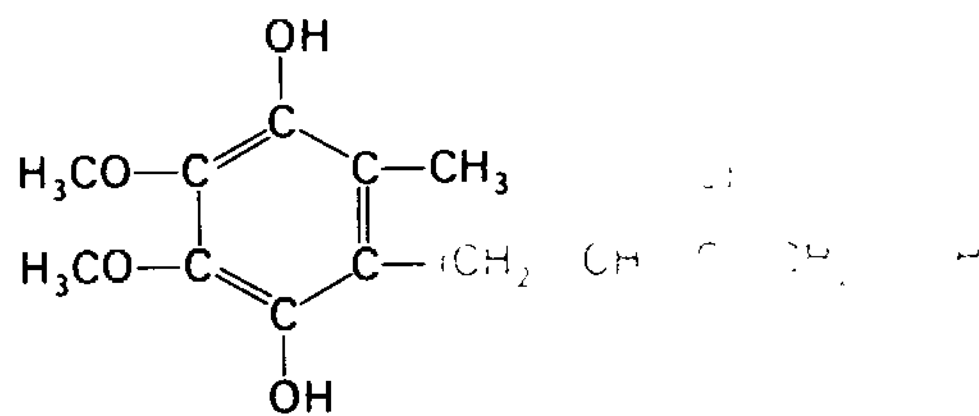
Кофермент Q - хиноновое производное с длинным изопреноидным хвостом. Его называют также *убихиноном* из-за его повсеместного распространения (ubiquitous) в биологических системах. Число изопреновых единиц в коферменте Q зависит от вида живых организмов. У млекопитающих его наиболее распространенная форма содержит десять изопреновых единиц и обозначается как Q_{10}.

Изопреноидный хвост обусловливает высокую неполярность Q, которая способствует его быстрой диффузии в углеводородной фазе внутренней митохондриальной мембраны. Кофермент Q - единственный переносчик электронов в дыхательной цепи, который не связан прочно с белком и не присоединен к нему ковалентно. *Кофермент Q действительно служит высокомобильным переносчиком электронов между флавопротеинами и цитохромами цепи переноса электронов.*

Напомним, что $FADH_2$ образуется в цикле трикарбоновых кислот при окислении сукцината в фумарат сукцинат-дегидрогеназой. Сукцинат-дегидрогеназа - один из двух компонентов *сукцинат-Q-редуктазного комплекса*; второй компонент Fe-S-белок. Этот комплекс, подобно NADH-Q-редуктазе, является интегральным компонентом внутренней митохон-



Окисленная форма кофермента Q_{10} (окисленный Q_{10})

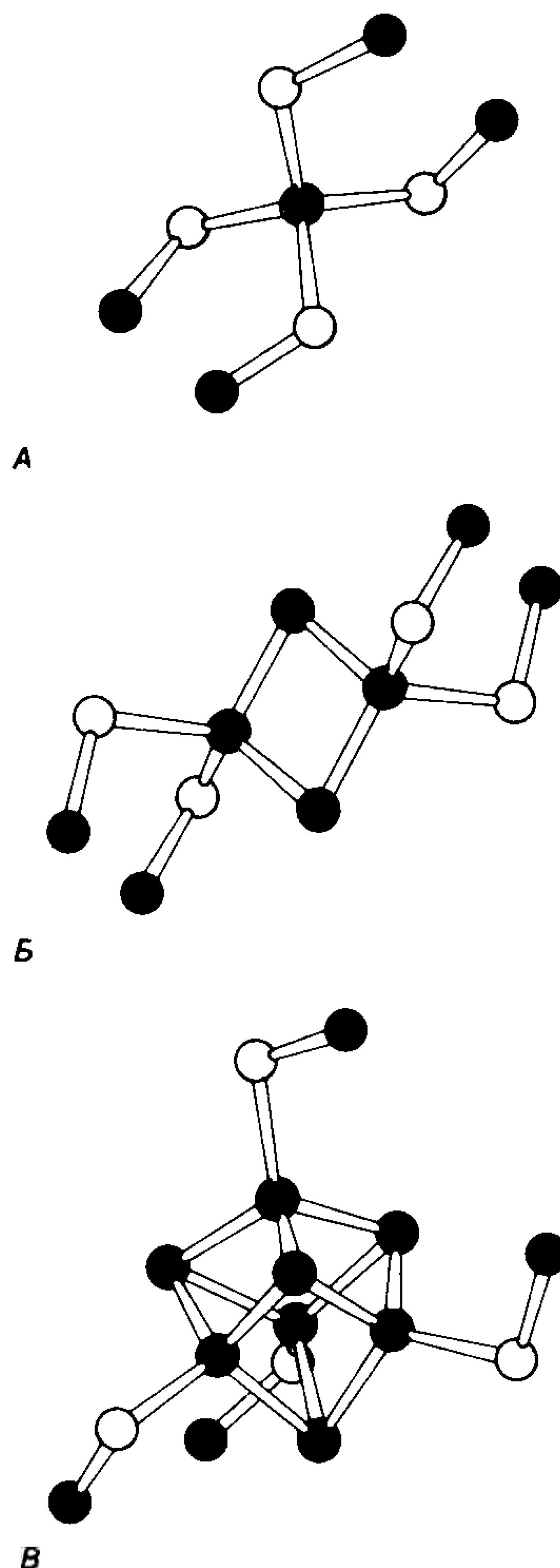


Восстановленная форма кофермента Q_{10} (восстановленный Q_{10})

дриальной мембраны. Обладающие высоким потенциалом электроны $FADH_2$ в сукцинат-дегидрогеназном компоненте переносятся затем на Fe-S-центры комплекса и далее на кофермент Q для включения в цепь переноса электронов. Подобно этому, глицеролфосфат-дегидрогеназа (разд. 14.9) и дегидрогеназа СоА-эфиров жирных кислот (разд. 17.8) переносят свои электроны с высоким потенциалом на кофермент Q с образованием его восстановленной формы QH_2.

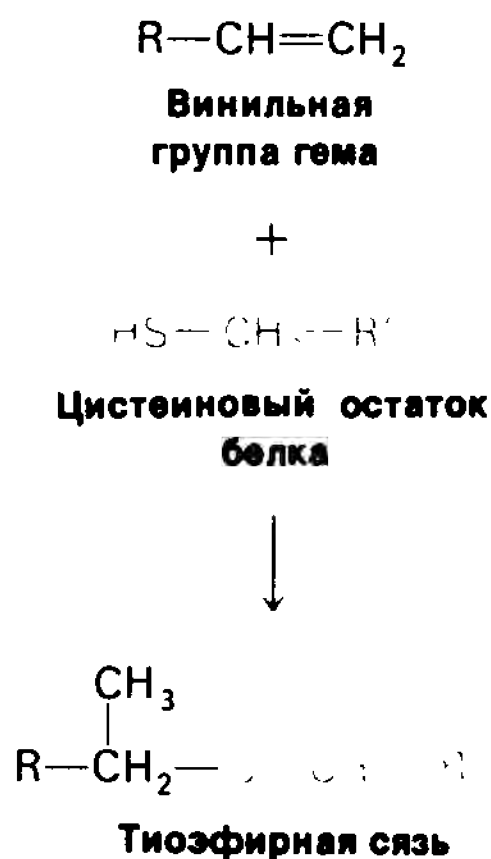
Переносчиками электронов между QH_2 и O_2 помимо одного Fe-S-белка служат все *цитохромы*. Центральную роль цитохромов в дыхании открыл в 1925 г. Дэвид Кейлин (David Keilin). *Цитохром – это переносящий электроны белок, молекула которого содержит в качестве простетической группы гем.* В ходе переноса электронов атом железа находится то в восстановленной ферроформе (+2), то в окисленной ферриформе (+3). Группа гема, подобно Fe-S-центру, *переносит только один электрон* в отличие от NADH, флавина и кофермента Q, переносящих по два электрона. Таким образом, молекула QH_2, восстановленной формы хинона, переносит свои два обладающие высоким потенциалом электрона на две молекулы цитохрома *b*, следующего члена цепи переноса электронов. В качестве промежуточного продукта при этих реакциях переноса электронов, возможно, образуется свободный радикал семихинона (обозначенный QH·).

В цепи переноса электронов на участке от QH_2 до O_2 располагаются пять цитохромов. Цитохромы *b* и c_1 наряду с Fe-S-белком являются компонентами *QH_2-цитохром-с-редуктазного комплекса*. Цитохром *c* переносит электроны от этого комплекса к *цитохром-с-оксидазному комплексу*, содержащему цитохромы *a* и a_3. Окисли-

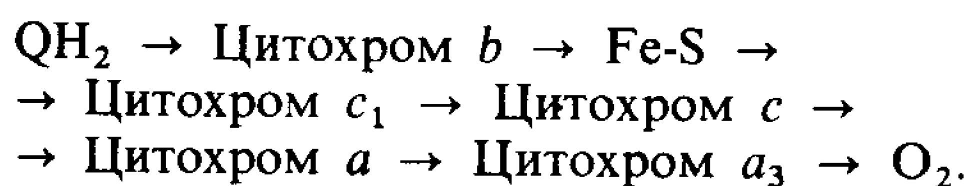


В

Рис. 14.5. Молекулярные модели Fe-S-комплексов: А) Fe-S-центр; Б) Fe_2-S_2-центр; В) Fe_4-S_4-центр. Атомы железа окрашены красным цветом, атомы серы цистеина – желтым, атомы неорганической серы – зеленым. (Из атомных координат модельных соединений, любезно предоставленных Jeremy Berg.)



тельно-восстановительный потенциал (сродство к электронам, или окислительная способность) этих цитохромов возрастает в последовательности

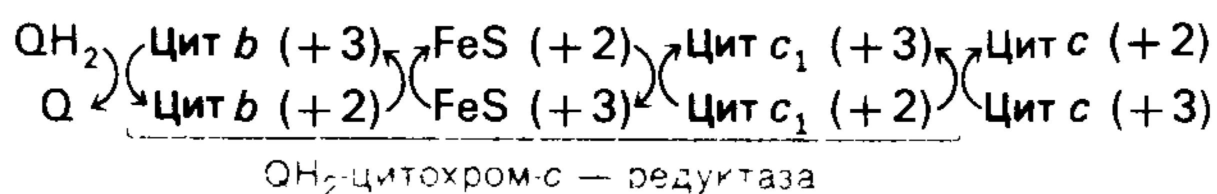


QH_2 → Цитохром *b* → Fe-S →
→ Цитохром c_1 → Цитохром *c* →
→ Цитохром *a* → Цитохром a_3 → O_2.

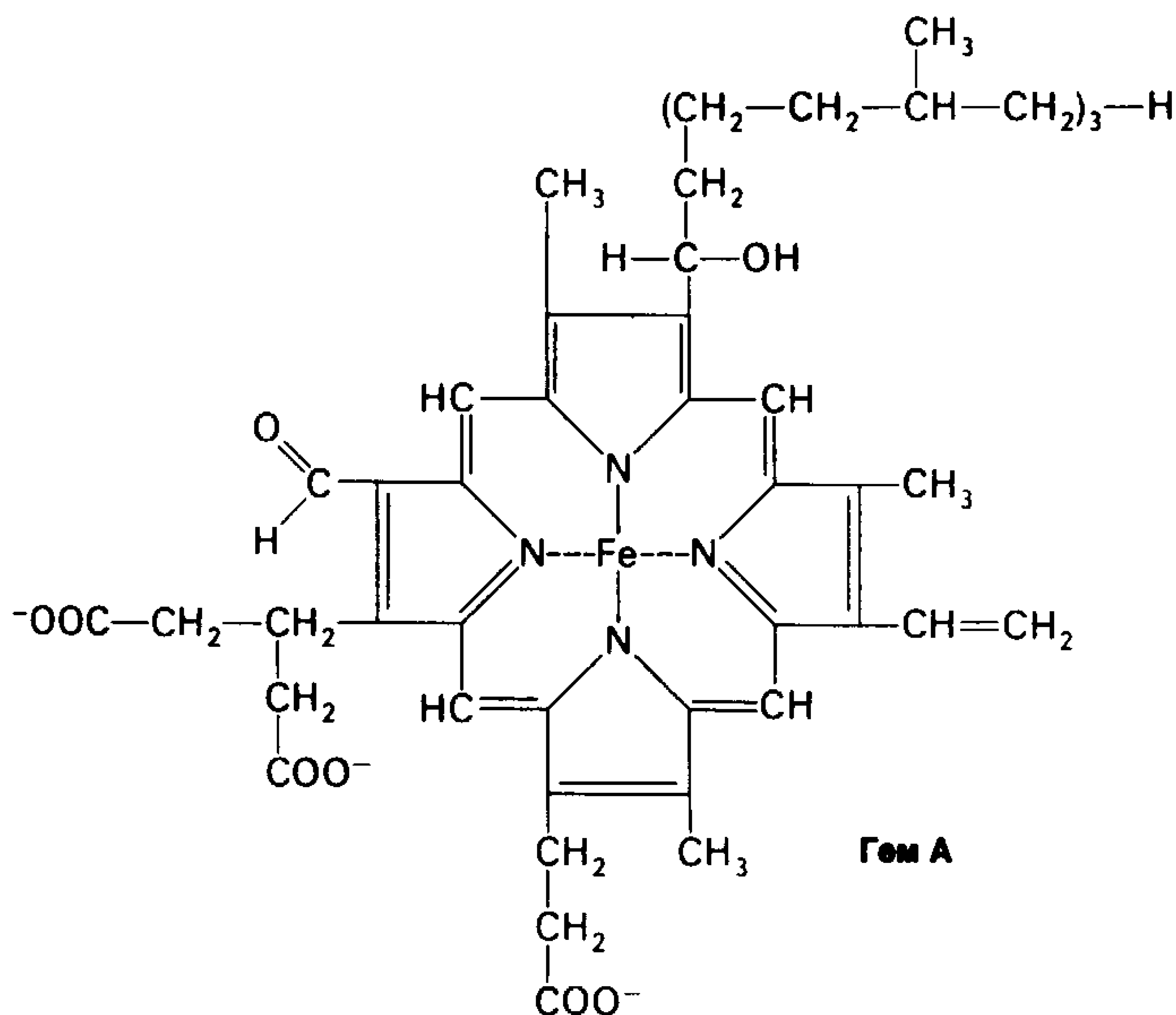
Указанные цитохромы различаются по структуре и свойствам. Простетической группой цитохромов *b*, c_1 и *c* служит железосодержащий протопорфирин IX, называемый обычно *гемом*, который является простетической группой также в миоглобине и гемоглобине. В цитохроме *b* гем не связан ковалентно с белком, тогда как в цитохромах *c* и c_1 он ковалентно присоединяется к белку при помощи тиоэфирных связей (рис. 14.6). Эти связи образуются путем присоединения сульфгидрильных групп двух цистеиновых остатков к винильным группам гема.

Цитохромы *a* и a_3 имеют иную железопорфириновую простетическую группу, называемую *гемом a*. Он отличается от гема цитохромов *c* и c_1 наличием формильной группы вместо одной из метильных групп и углеводородной цепи вместо одной из винильных групп. Цитохромы *a* и a_3 являются конечными звеньями дыхательной цепи. Они существуют в виде комплекса, иногда называемого *цитохромоксидазой*.

QH_2-цитохром-*c*-редуктазный комплекс переносит электроны от QH_2 к цитохрому *c*, водорастворимому периферическому мембранному белку (разд. 14.15–14.17).



Затем восстановленный цитохром *c* переносит свои электроны на *цитохром-c-оксидазный комплекс*. Роль цитохрома *c* аналогична роли кофермента Q: он служит мобильным переносчиком электронов между



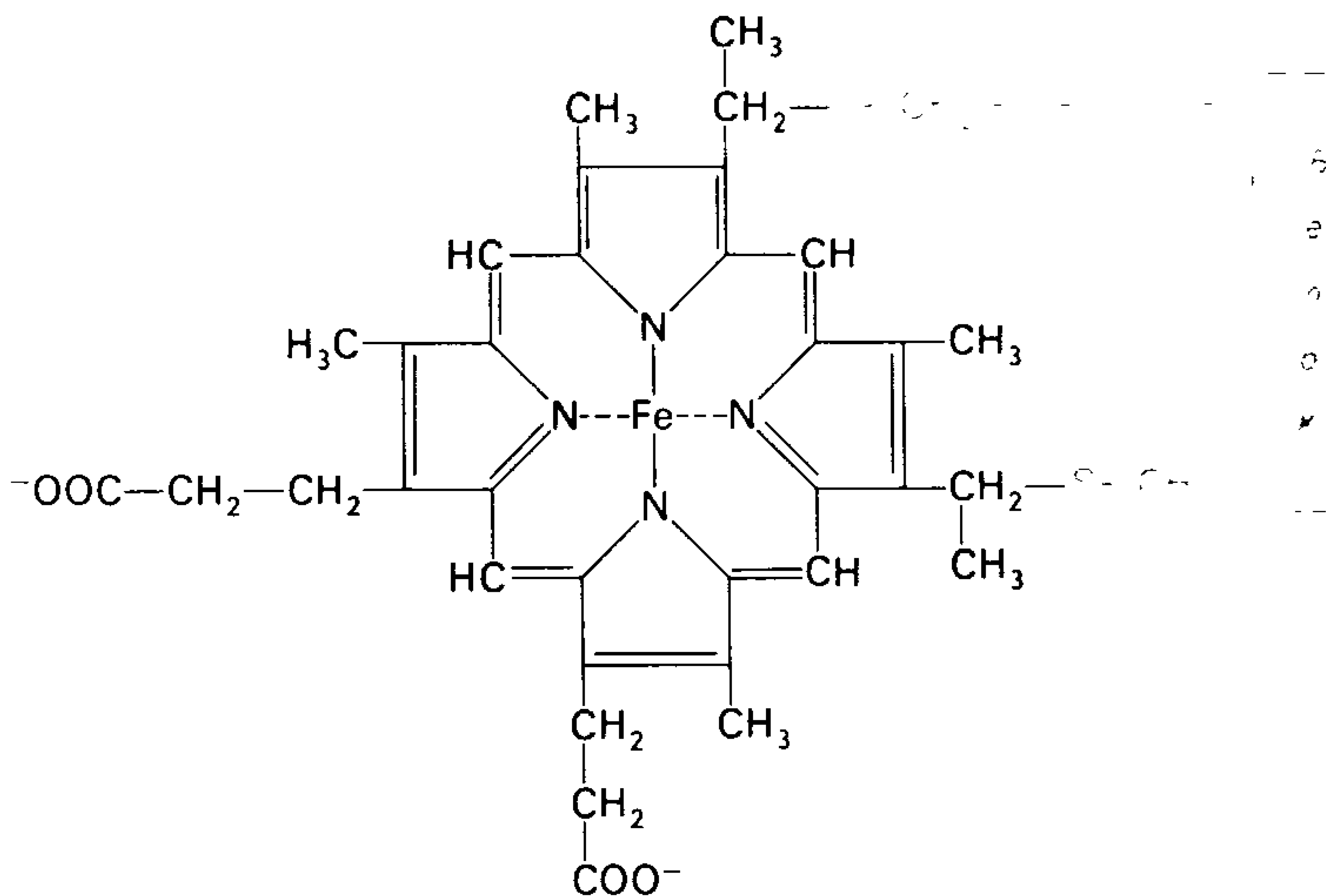


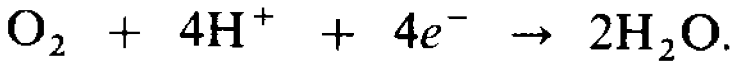
Рис. 14.6. Гем в цитохромах c и c_1 ковалентно присоединен к двум цистеиновым боковым цепям.

различными комплексами в дыхательной цепи. Электроны переносятся к *а*-цитохромному компоненту комплекса и затем к цитохрому a_3, содержащему медь. При транспорте электронов от цитохрома a_3 к моле-

Цит *c* (+2) Цит *a* (+3) Цит a_3 (+2) Cu (+2) H_2O
Цит *c* (+3) Цит *a* (+2) Цит a_3 (+3) Cu (+1) O_2

Цитохром-*c* —оксидаза

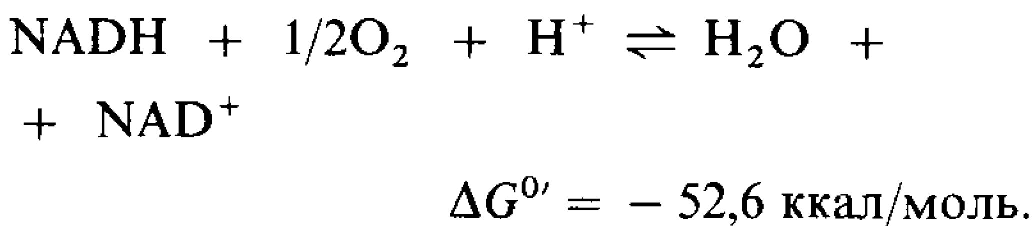
кулярному кислороду атом меди существует то в окисленной (+ 2), то в восстановленной (+ 1) форме. Образование воды – процесс, связанный с переносом четырех электронов, тогда как группы гема являются переносчиками одного электрона. Каким образом четыре электрона «сходятся» для восстановления молекулы O_2, пока не установлено:



$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O.$$

14.5. Сопряжение окисления и фосфорилирования осуществляется протонным градиентом

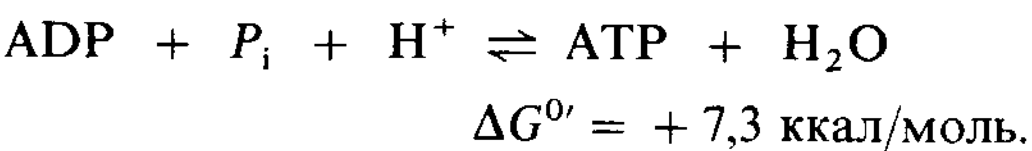
Рассмотрим теперь поток электронов от NADH к O_2, представляющий собою экзергонический процесс:



$$NADH + 1/2O_2 + H^+ \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -52{,}6 \text{ ккал/моль}.$$

Эта свободная энергия окисления используется для синтеза ATP:



$$ADP + P_i + H^+ \rightleftharpoons ATP + H_2O$$

$$\Delta G^{0\prime} = +7{,}3 \text{ ккал/моль}.$$

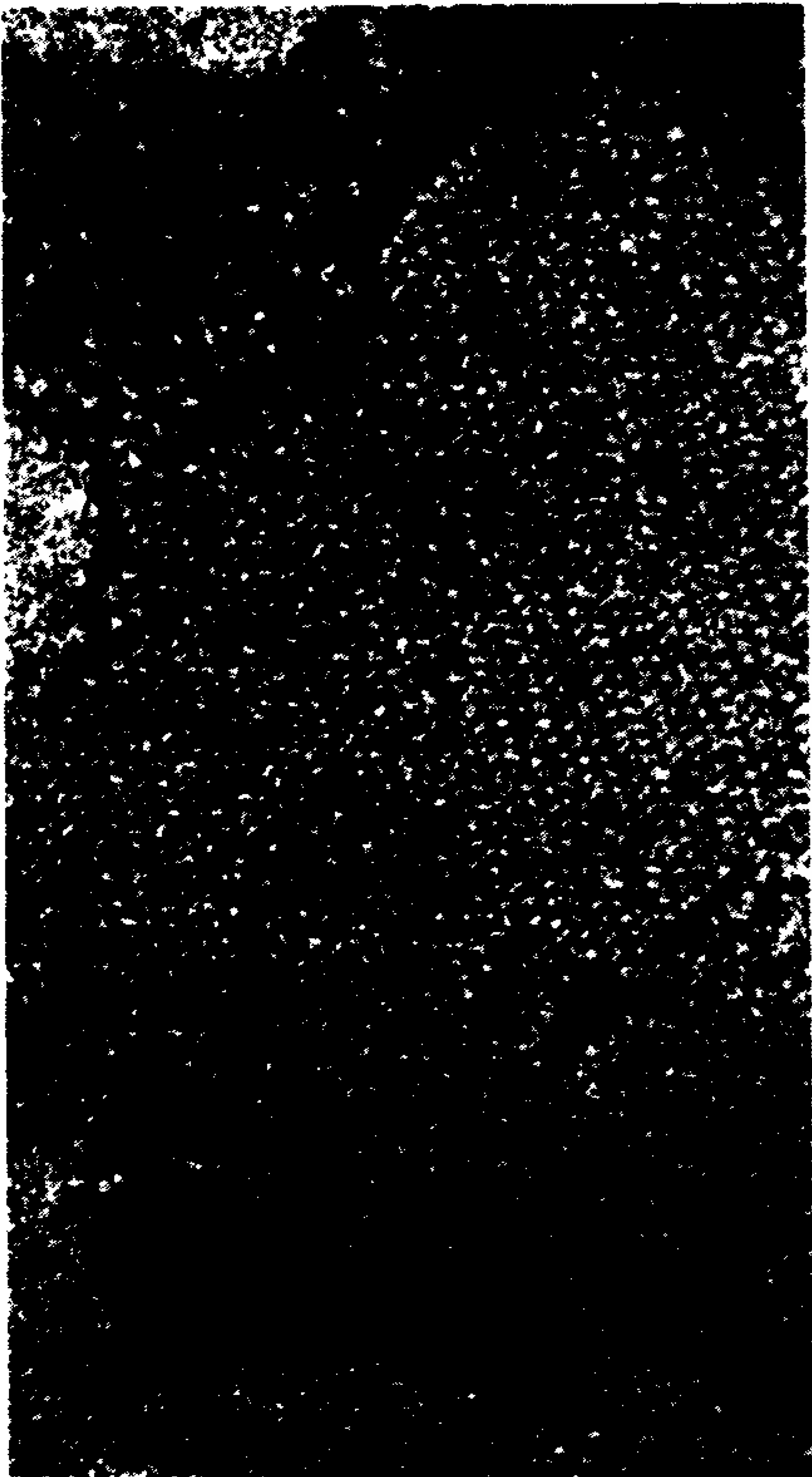


Рис. 14.7. Электронная микрофотография двухмерной кристаллической структуры цитохром-*c*-оксидазы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Steven Fuller и д-ра Roderick Capaldi.)

Синтез ATP осуществляется молекулярными ансамблями во внутренней митохондриальной мембране. Соответствующий ферментный комплекс (разд. 14.8) назван *митохондриальной АТРазой*, потому что он был открыт благодаря способности катализировать гидролитические реакции.

Каким образом осуществляется сопряжение между окислением NADH и фосфорилированием ADP? Вначале предполагалось, что при переносе электронов происходит образование ковалентного высокоэнергетического промежуточного продукта, являющегося предшественником ATP. Эта гипотеза химического сопряжения основывалась на механизме субстратного фосфорилирования, примером которого служила глицеральдегид-3-фосфат – дегидрогеназная реакция, приводящая к образованию 1,3-БФГ – высокоэнергетического промежуточного продукта (разд. 12.14). Высказывалось и другое предположение, а именно что свободная энергия окисления улавливается белком, находящимся в активированной конформации, что затем стимулирует синтез ATP. Исследователи во многих лабораториях в течение десятилетий пробовали выделить эти предполагаемые высокоэнергетические промежуточные продукты, но все предпринятые попытки оказались безуспешными.

Совершенно иной механизм, *хемиосмотическую гипотезу*, постулировал Питер Митчелл (Peter Mitchell) в 1961 г. Он предположил, что сопряжение переноса электронов и синтеза ATP обеспечивается протонным градиентом, а не высокоэнергетическим ковалентным промежуточным продуктом или активированным белком. Согласно этой модели, перенос электронов по дыхательной цепи приводит к выбросу протонов из матрикса на цитоплазматическую сторону внутренней митохондриальной мембраны, где таким образом возрастает концентрация ионов H^+. В результате происходит генерирование мембранного потенциала с положительным зарядом на цитоплазматической стороне мембраны (рис. 14.8). Эта протонодвижущая сила, постулирует автор, запускает синтез ATP АТРазным комплексом. В описанной модели взаимодействие между цепью переноса электронов и АТР-синтезирующим комплексом осуществляется лишь благодаря наличию мембранного потенциала. Модель требует, чтобы переносчики электронов в дыхательной цепи и АТРаза имели *векторную организацию*, т. е. чтобы они были определеннным образом ориентированы по отношению к двум поверхностям внутренней митохондриальной мембраны. Далее, внутренняя митохондриальная мембрана должна быть совершенно непроницаема для протонов, поскольку для существования протонного градиента необходимо наличие *замкнутого компартмента*. Основной смысл предложенного механизма состоит в том, что *первичным запасающим энергию актом является перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану*.

Гипотеза Митчелла о сопряжении окисления и фосфорилирования протонным гра-

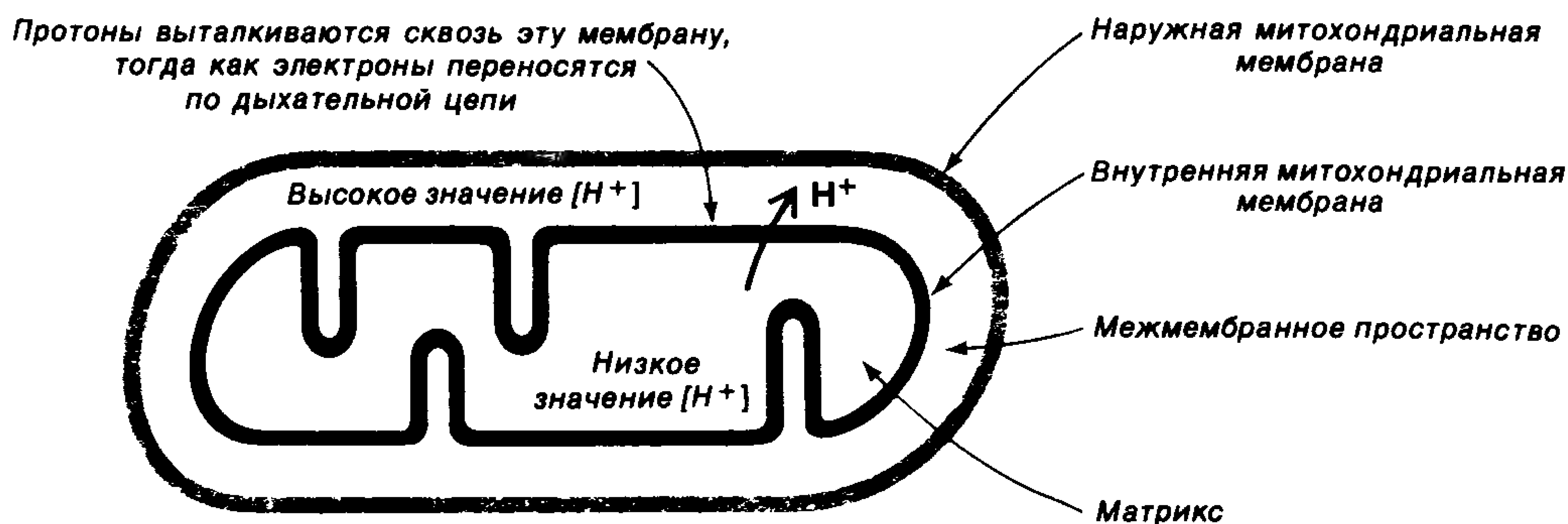


Рис. 14.8. При переносе электронов по дыхательной цепи происходит генерирование протонного градиента и мембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране.

диентом получила к настоящему времени множество подтверждений.

1. Протонный градиент через внутреннюю митохондриальную мембрану создается во время переноса электронов. pH с наружной стороны на 1,4 единицы ниже, чем с внутренней, и мембранный потенциал составляет 0,14 В, причем наружная сторона несет положительный заряд. Общий электрохимический потенциал Δp (в вольтах) складывается из мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и градиента концентрации ионов H^+ (ΔpH). В приведенном ниже уравнении R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, F – число Фарадея.

$$\Delta p = \Delta\psi - \frac{RT}{F}\Delta pH = \Delta\psi - 0{,}06\Delta pH =$$

$$= 0{,}14 - 0{,}06(-1{,}4) = 0{,}224 \text{ В}.$$

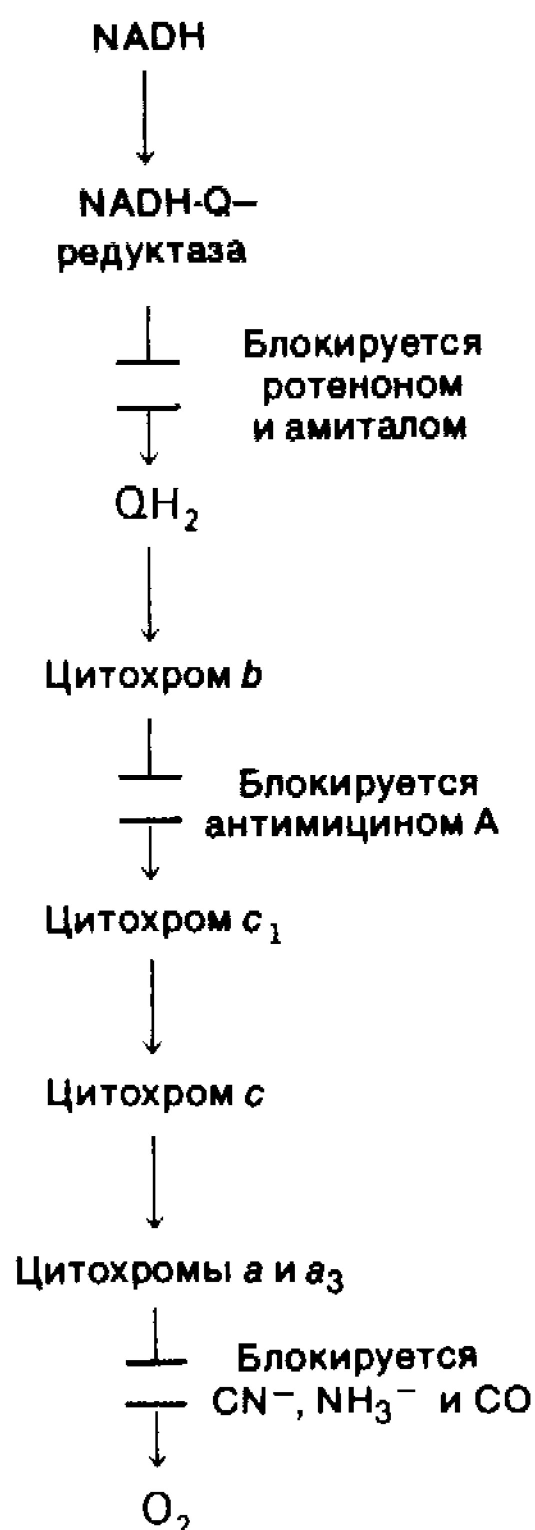


Рис. 14.9. Пункты действия некоторых ингибиторов транспорта электронов.

Эта общая протонодвижущая сила в 0,224 В соответствует свободной энергии 5,2 ккал в расчете на 1 моль протонов.

2. При создании градиента pH в митохондриях или хлоропластах (разд. 19.13) в них происходит синтез АТР в отсутствие переноса электронов.

3. Белок пурпурных мембран галобактерий при освещении перекачивает протоны (разд. 19.21). Синтетические пузырьки, содержащие этот бактериальный белок и очищенную АТРазу из митохондрий сердца крупного рогатого скота, синтезируют АТР при освещении. В этом опыте белок пурпурных мембран заменяет дыхательную цепь; следовательно, дыхательная цепь и АТРаза – биохимически отдельные системы, связываемые только протонным градиентом.

4. И дыхательная цепь (разд. 14.7), и АТРаза (разд. 14.8) имеют векторную организацию во внутренней митохондриальной мембране.

5. Для окислительного фосфорилирования существенное значение имеет замкнутость компартментов. В растворимых препаратах или в мембранных фрагментах, лишенных хорошо отграниченных внутренних и внешних компартментов, не происходит синтеза АТР, сопряженного с переносом электронов.

6. Вещества, переносящие протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану, разрушают протонный градиент и таким образом вызывают разобщение окисления и фосфорилирования (разд. 14.14).

14.6. Протонный градиент генерируется в трех пунктах

Выброс протонов происходит в трех пунктах потока электронов по дыхательной цепи от NADH к O_2 (рис. 14.9): *1-й пункт* – это NADH-Q – редуктазный комплекс; *2-й пункт* – QH_2-цитохром-*c* – редуктазный комплекс; *3-й пункт* – цитохром-*c* – оксидазный комплекс. Протонный градиент, генерируемый в каждом из пунктов при переносе пары электронов от NADH, используется для синтеза одной молекулы АТР. Для идентификации этих пунктов применялись различные экспериментальные подходы.

1. *Сравнение выхода АТР при окислении нескольких субстратов.* Окисление NADH дает три АТР, тогда как окисление сукцината дает два АТР. Электроны от $FADH_2$ поступают в цепь переноса электронов на

уровне кофермента Q, который находится на более низком энергетическом уровне, чем 1-й пункт фосфорилирования. При окислении нефизиологического субстрата аскорбата образуется только одна молекула ATP, потому что электроны аскорбата поступают на цитохром *c*, находящийся на более низком энергетическом уровне, чем 2-й пункт фосфорилирования. Окислительное фосфорилирование часто характеризуют отношением $P:O$ – число молей неорганического фосфата, включающегося в органическую форму, в расчете на один атом потребляемого кислорода. Отношения P : O для окисления NADH, сукцината и аскорбата составляют соответственно 3, 2 и 1.

2. *Термодинамические измерения.* Значение $\Delta G^{0\prime}$ для переноса электронов от NADH на находящийся на более низком энергетическом уровне Fe-S-центр в NADH-Q – редуктазе составляет – 12 ккал/моль; для переноса электронов от цитохрома *b* к c_1 в QH_2-цитохром-*c* – редуктазе – 10 ккал/моль и от цитохрома *a* к O_2 в цитохром-*c* – оксидазе – 24 ккал/моль. Эти окислительно-восстановительные реакции являются в достаточной степени экзергоническими для запуска синтеза ATP при стандартных условиях ($\Delta G^{0\prime} = -7{,}3$ ккал/моль). Значения $\Delta G^{0\prime}$ для других реакций переноса электронов, опосредуемых коферментом Q и цитохромом *c*, слишком малы для поддержания синтеза ATP.

3. *Специфическое ингибирование тока электронов.* Ротенон и амитал специфически ингибируют перенос электронов в NADH-Q – редуктазном комплексе и таким образом предотвращают генерирование протонного градиента в 1-м пункте (см. рис. 14.9). В то же время указанные ингибиторы не нарушают окисления сукцината, поскольку электроны этого субстрата поступают в цепь переноса электронов после блока кофермента Q. *Антимицин А* тормозит ток электронов между цитохромами *b* и c_1, предотвращая синтез ATP, сопряженный с генерированием протонного градиента во 2-м пункте. Этот блок можно обойти добавлением аскорбата, который непосредственно восстанавливает цитохром *c*. Электроны затем пойдут от цитохрома *c* к O_2 с одновременным синтезом ATP, сопряженным с протонным градиентом в 3-м пункте. Наконец, ток электронов может быть блокирован между цитохромоксидазным комплексом и O_2 под действием CN^-, N_3^- и CO. Цианид и азид реагируют с ферриформой этого переносчика, тогда как оксид углерода ингибирует ферроформу. В присутствии этих ингибиторов из-за блокирования тока электронов не происходит фосфорилирования, сопряженного с генерированием протонного градиента в 3-м пункте.

Места действия этих ингибиторов были установлены с использованием *метода перекреста.* Бриттон Чанс (Britton Chance) предложил изящный спектроскопический метод для определения соотношения окисленной и восстановленной форм каждого переносчика. В основе метода лежит тот факт, что окисленная и восстановленная формы каждого переносчика имеют свои характерные спектры поглощения. Добавление ингибитора переноса электронов изменяет соотношение этих форм. Например, добавление антимицина А вызывает переход переносчиков, локализованных в электронтранспортной цепи между NADH и цитохромом *b*, в более восстановленное состояние, а переносчиков между цитохромом *c* и O_2 – в более окисленное состояние. Отсюда можно заключить, что антимицин А подавляет превращение цитохрома *b* в цитохром c_1, потому что этот этап является *пунктом перекреста.*

4. *Синтез системы пузырьков, содержащих лишь один пункт выброса протонов.* Каждый из трех участков выброса протонов был воспроизведен в синтетических фосфолипидных пузырьках, содержащих ATPазу. Добавление к таким пузырькам окисляемого субстрата приводит к генерированию протонодвижущей силы, достаточной для синтеза одной молекулы ATP на пару электронов.

14.7. Протоны выталкиваются асимметрично ориентированными трансмембранными комплексами

Генерирование протонного градиента при потоке электронов через три участка дыхательной цепи, в которых происходит запасание энергии, требует их асимметричной ориентации. Кроме того, три соответствующих ферментных комплекса должны располагаться на мембране таким образом, чтобы протоны могли перекачиваться со стороны матрикса на цитоплазматическую сторону. Изучению этих важных аспектов

6-31

Таблица 14.2. **Компоненты митохондриальной цепи переноса электронов. [De Pierre J. W., Ernster L., Ann. Rev. Biochem., 46, 215 (1977)]**

Ферментный комплекс	Масса, кДа	Простетическая группа	Локализация связывающих участков[1]		
			М-сторона	УС	Ц-сторона
NADH-Q-редуктаза	850	FMN Fe-S	NADH	Q	
Сукцинат-Q-редуктаза	97	FAD Fe-S	Сукцинат	Q	
QH_2-цитохром *c*	280	Гем *b* Гем c_1 Fe-S		Q	Цитохром *c*
Цитохром *c*	13	Гем *c*			Цитохром c_1 Цитохром *a*
Цитохром-c—оксидаза	200	Гем *a* Гем a_3 Cu	O_2		Цитохром *c*

[1] Все компоненты – интегральные мембранные белки, кроме цитохрома *c*, представляющего собою водорастворимый периферический мембранный белок, и кофермента Q, который является липидорастворимым хиноном. М-сторона – поверхность, обращенная к матриксу. УС – углеводородная середина и Ц-сторона – поверхность внутренней митохондриальной мембраны, обращенная к цитоплазме.

цепи переноса электронов в большой мере способствовало использование субмитохондриальных частиц, образующихся при озвучивании митохондрий (рис. 14.10). Наружная поверхность субмитохондриальных частиц соответствует обращенной к матриксу поверхности внутренней мембраны интактной митохондрии. Таким образом, обе поверхности внутренней митохондриальной мембраны – обращенная к цитоплазме поверхность в интактной митохондрии и обращенная к матриксу поверхность субмитохондриальных частиц – доступны экспериментальному исследованию. Расположение белковых компонентов дыхательной цепи в этих препаратах изучали, используя протеолитические ферменты, специфические антитела, лектины и не проникающие через мембраны меченые реагенты. Например, субъединицы II, V и VI цитохромоксидазы могут быть помечены только со стороны матрикса. Цитохромоксидаза связывает цитохром *c* исключительно на цитоплазматической поверхности и перекачивает протоны только в одном направлении. Эти эксперименты и аналогичные исследования, проведенные с NADH-Q – редуктазой и QH_2-цитохром-*c* – редуктазой (табл. 14.2), показали, что *все три запасающие энергию системы пронизывают насквозь внутреннюю митохондриальную мембрану и ориентированы асимметрично.*

Откуда берутся транслоцируемые протоны? Одна из возможностей состоит в том, что это – протоны, которые *непосредственно* участвуют в химических реакциях, катализируемых указанными тремя системами. Например, когда NADH передает два электрона на NADH-Q – редуктазный комплекс, в этот процесс включаются два H^+ – один от самого NADH и второй из растворителя. Согласно другому предположению, транслоцируемые протоны могут возникать *непрямым путем, при конформационных взаимодействиях* между каталитическим и белоксвязывающим центрами в различных участках ферментного комплекса. Стехиометрия реакций переноса электронов говорит о том, что только один протон в расчете на электрон или два протона на каждый запасающий энергию участок (пункт фосфорилирования) могут быть «перекачаны» посредством прямого механизма. В то же время отношение H^+/участок, запасающий энергию, находится, как оказалось, в интервале от 3 до 4, что не согласуется с прямым механизмом процесса. Представляется ве-

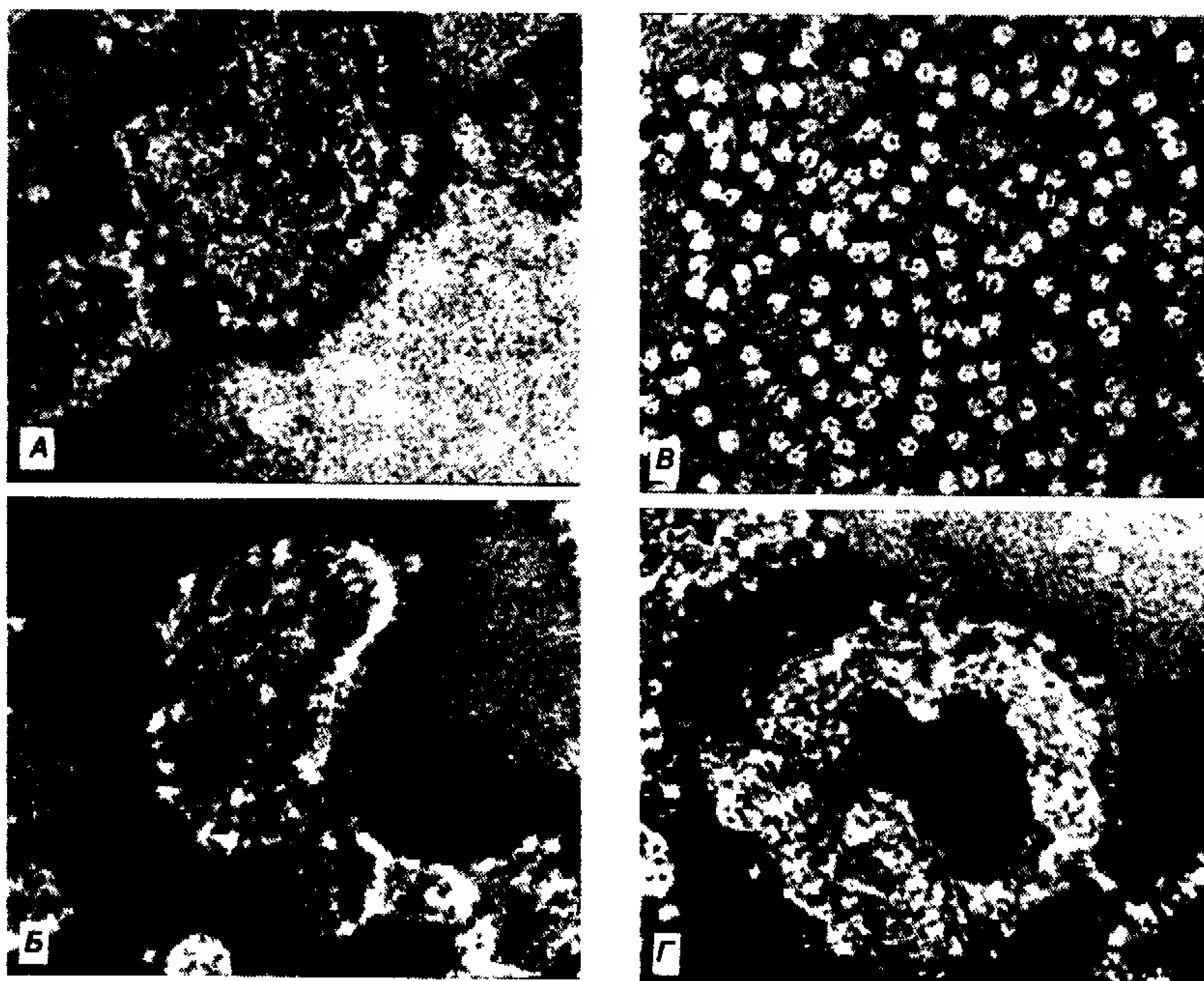


Рис. 14.10. Электронные микрофотографии. *А* - субмитохондриальная частица с выступами F_1 на ее поверхности; *Б* - субмитохондриальная частица, обработанная мочевиной, удаляющей выступы F_1; *В* - изолированные F_1 и *Г* - реконструированная субмитохондриальная частица, образованная путем добавления F_1 (фактора сопряжения) к «ободранным» мембранам. Частица, показанная на рис. *Б*, может переносить электроны на O_2, но неспособна к образованию АТР. Реконструированная частица, показанная на рис. *Г*, осуществляет окислительное фосфорилирование. (Печатается с любезного разрешения д-ра Efraim Racker.)

роятным, что перенос электронов через *каждый запасающий энергию участок вызывает перемежающиеся конформационные изменения, которые способствуют переходу протонов из матриксной стороны на цитоплазматическую сторону мембраны.* Напомним, что протоны, участвующие в эффекте Бора в гемоглобине, поступают из участка молекулы, отдаленного от группы гема (разд. 4.16).

14.8. АТР синтезируется при обратном токе протонов в матрикс через протонные каналы

Обратимся теперь к использованию протонного градиента для синтеза АТР. Фермент, катализирующий этот процесс, выявляется на электронных микрофотографиях субмитохондриальных частиц в виде сферических выступов на поверхности (рис. 14.10). В интактных митохондриях такие выступы находятся на той стороне внутренней митохондриальной мембраны, которая обращена к матриксу. В 1960 г. Эфраим Рэкер (Efraim Racker) обнаружил, что эти округлые выступы (диаметром 85 Å) можно удалить механическим встряхиванием. «Ободранные» субмитохондриальные частицы сохраняют способность к переносу электронов по своей цепи переноса электронов, но синтеза АТР при этом более не происходит. Отделившиеся же выступы диаметром 85 Å катализируют гидролиз АТР. Но самым интересным в наблюдениях Рэкера оказался следующий факт: добавление таких АТРазных выступов к «ободранным» субмитохондриальным частицам восстанавливало их способность синтезировать АТР. Эти выступы называют *сопрягающим фак-*

тором 1, или F_1. Физиологическая роль F_1 состоит в том, чтобы катализировать синтез ATP. АТРазная активность, проявляемая солюбилированным F_1 (в отсутствие протонного градиента),– результат обращения присущей ему физиологической реакции.

F_1-компонент, масса которого составляет 360 кДа и который содержит пять видов полипептидных цепей (табл. 14.3), представляет собою только часть АТР-синтезирующего механизма митохондрий. Другой важный компонент этого комплекса – F_0, гидрофобный сегмент из четырех полипептидных цепей, «заякореннный» на внутренней митохондриальной мембране. *F_0 – это протонный канал комплекса.* «Стебелек» между F_0 и F_1 включает некоторые другие белки (табл. 14.3). Один из них сообщает комплексу чувствительность к олигомицину,

Таблица 14.3. **Компоненты АТР-синтезирующего комплекса митохондрий (De Pierre J. W., Ernster L., Ann. Rew. Biochem., 46,-216, 1977)**

Субъединицы	Масса, кДа	Роль	Локализация
F_1	360	Содержит каталитический участок для синтеза ATP	Сферический выступ на матричной стороне
α	53		
β	50		
γ	33		
δ	17		
ε	7		
F_0	29	Содержит протонный канал	Трансмембранная
	22		
	12		
	8		
Ингибитор F_1	10	Регулирует ток протонов и синтез ATP	«Стебелек» между F_0 и F_1
Белок, обусловливающий чувствительность к олигомицину	18		
$Fc_2(F_6)$	8		

антибиотику, блокирующему синтез ATP путем нарушения использования протонного градиента.

Ток протонов через канал F_0 от цитоплазматической стороны мембраны к матриксу приводит к синтезу ATP, осуществляемому F_1. Каким образом ток протонов оказывается сопряженным с синтезом ATP? Как и в случае перекачки протонов, здесь возможны прямой и непрямой механизмы. Существует предположение, что ток протонов непосредственно действует на реакцию синтеза ATP. Согласно этой схеме, P_i активируется и одновременно взаимодействует с ADP, образуя ATP. Существует и другое предположение, а именно что сопряжение тока протонов с синтезом ATP осуществляется путем конформационных изменений, передаваемых через ферментный комплекс.

14.9. Электроны от цитоплазматического NADH поступают в митохондрии при помощи глицерофосфатного челночного механизма

Интактные митохондрии непроницаемы для NADH и NAD^+. Как же тогда происходит окисление цитоплазматического NADH дыхательной цепью? NADH образуется в процессе гликолиза при окислении глицеральдегид-3-фосфата. Чтобы гликолиз продолжал функционировать, должно происходить генерирование NAD^+. Решение этой проблемы состоит в том, что через митохондриальную мембрану переносится *не сам NADH, а отдаваемые им электроны.* Одним из переносчиков является *глицерол-3-фосфат*, который легко проходит через наружную митохондриальную мембрану. Первый шаг в этом челночном механизме (рис. 14.11) – перенос электронов от NADH на дигидроксиацетонфосфат с образованием глицерол-3-фосфата. Эта реакция, катализируемая глицерол-3-фосфат – дегидрогеназой, протекает в цитозоле. Глицерол-3 – фосфат поступает затем в митохондрии, где он снова окисляется в дигидроксиацетонфосфат при участии FAD – простетической группы дегидрогеназы, которая связана с внутренней митохондриальной мембраной. FAD-зависимая глицеролдегидрогеназа митохондрий отличается от NAD^+-зависимой глицерол-дегидрогеназы цитозоля. Образовавшийся при окислении глицерол-3-фосфата дигидроксиацетонфосфат далее диффундирует из митохондрий в цитозоль, завершая челночный процесс.

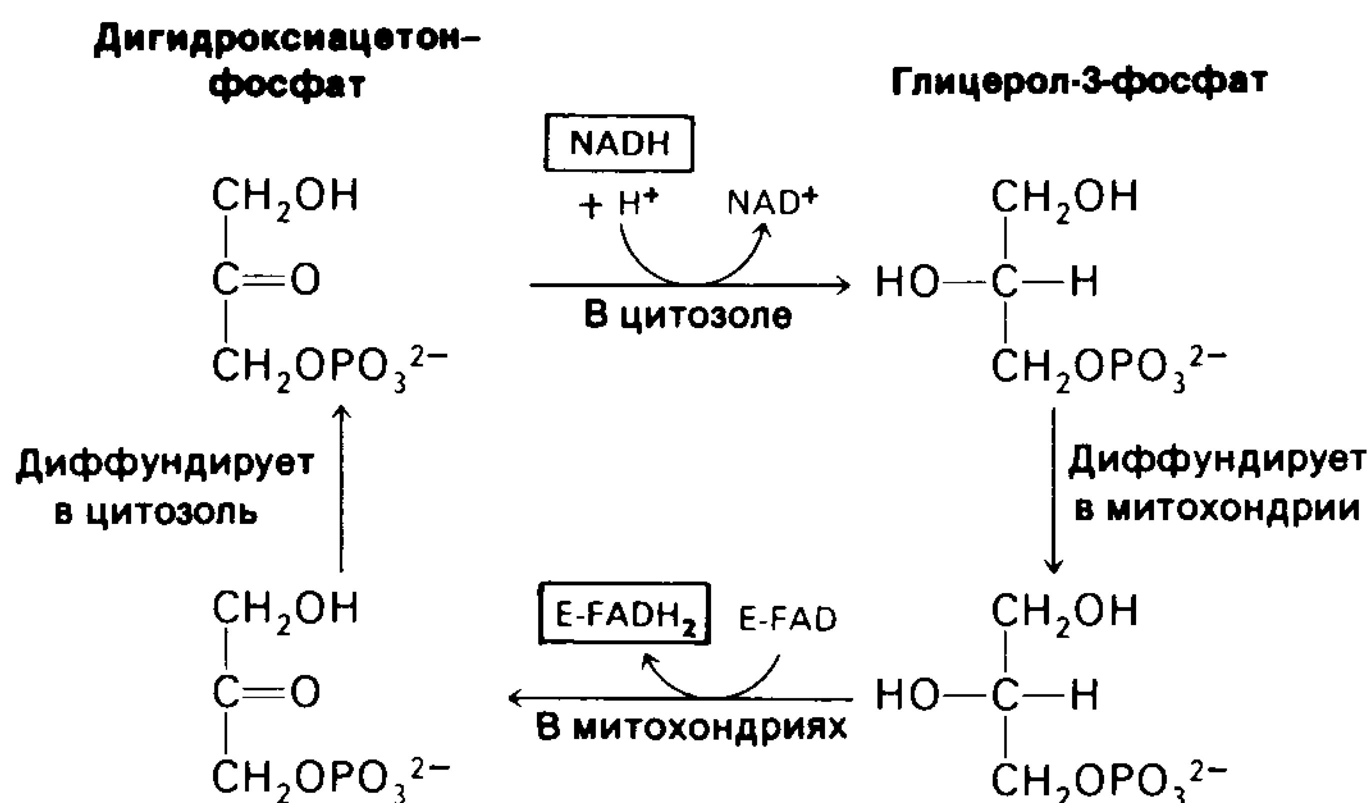
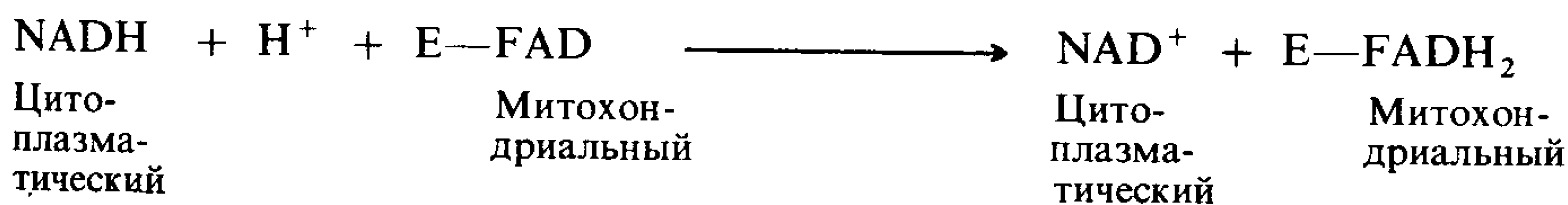


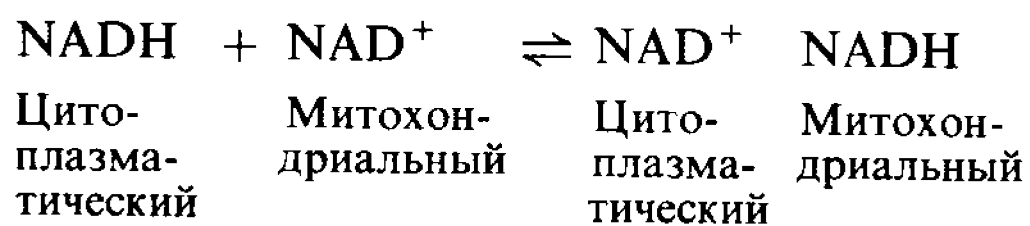
Рис. 14.11. Глицеролфосфатный челночный механизм.

Суммарная реакция может быть изображена следующим образом:



Восстановленный флавин внутри митохондрий переносит свои электроны на дыхательную цепь на уровне кофермента Q. *Таким образом, при окислении дыхательной цепью NADH, который переносится глицеролфосфатным челночным механизмом, образуются две, а не три молекулы ATP.* На первый взгляд может показаться, что в каждом цикле этого процесса одна молекула ATP теряется. Такой низкий выход связан с предпочтительным использованием в митохондриях FAD, а не NAD^+ в качестве акцептора электронов в реакции, катализируемой глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой. Использование FAD делает возможным перенос электронов в митохондрии от цитоплазматического NADH против градиента концентрации NADH. «Цена» такого транспорта – одна молекула ATP на два электрона. Глицеролфосфатный челночный механизм играет особенно важную роль в летательных мышцах насекомых.

В сердце и печени электроны транспортируются в митохондрии от цитоплазматического NADH благодаря *малат-аспартатному челночному механизму*, который опосредуется двумя мембранными переносчиками и четырьмя ферментами. В цитозоле происходит перенос электронов от NADH на малат, который проходит сквозь внутреннюю митохондриальную мембрану и затем вновь окисляется с образованием NADH в митохондриальном матриксе. Оксалоацетат не проходит легко через внутреннюю митохондриальную мембрану и должен превратиться в результате реакции трансаминирования в аспартат, способный проходить сквозь данный барьер. Суммарная реакция малат-аспартатного челночного механизма описывается следующим уравнением:



Этот механизм в противоположность глицеролфосфатному челночному механизму характеризуется легкой обратимостью. Следовательно, NADH может поступать в митохондрии по малат-аспартатному челночному механизму только при условии, что отношение $[NADH]/[NAD^+]$ выше в цитозоле, чем в митохондриальном матриксе. При переносе электронов от NADH к митохондриальной дыхательной цепи с помощью данного механизма не происходит поглощения энергии, и на каждую транспортируемую молекулу NADH синтезируются три молекулы ATP.

14.10. Поступление ADP в митохондрии требует выхода ATP

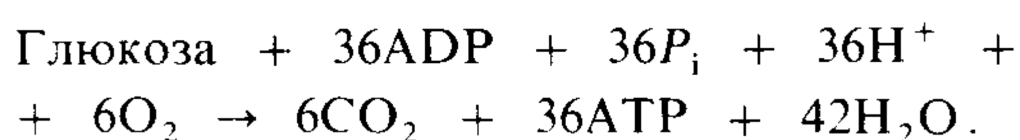
ATP и ADP не могут диффундировать свободно через внутреннюю митохондриальную мембрану. Переход этих высокозаряженных молекул через этот барьер оказывается возможным благодаря наличию специфического переносчика. Интересная особенность переноса – сопряжение токов ATP и ADP. *ADP поступает в митохондриальный матрикс только при условии выхода ATP и наоборот.* Этот сопряженный поток ATP и ADP представляет собою пример *облегченной обменной диффузии.* Он опосредуется *ATP-ADP—транслоказой*, димером, состоящим из идентичных субъединиц с мол. массой 29 кДа каждая. Транслоказа имеется в большом количестве во внутренней митохондриальной мембране, составляя около 6% общего белка. На цитоплазматическую сторону мембраны транспортируется предпочтительно ADP. Именно этим отчасти и объясняется тот факт, что соотношение [ATP]/[ADP][P_i] на той стороне мембраны, которая обращена к цитоплазме, в 10 раз выше, чем на стороне, обращенной к матриксу. Сопряженный транспорт ATP и ADP транслоказой, вероятно, индуцируется протонным градиентом через внутреннюю митохондриальную мембрану. ATP-ADP—транслоказа специфически ингибируется очень низкими концентрациями *атрактилозида*, растительного гликозида, или *бонгкрековой кислоты*, антибиотика из плесени. Вскоре после добавления этих ингибиторов окислительное фосфорилирование прекращается, поскольку поступления ADP внутрь митохондрии больше не происходит.

14.11. Митохондрии содержат многочисленные транспортные системы для ионов и метаболитов

ATP-ADP—транслоказа – это только одна из многих транспортных систем митохондрий. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит целый ряд переносчиков для ионов и заряженных метаболитов. Например, *переносчик дикарбоновых кислот* опосредует облегченную обменную диффузию малата, сукцината, фумарата и P_i. *Переносчики трикарбоновых кислот* обеспечивают обмен OH^- на P_i. Пируват цитозоля поступает в митохондриальный матрикс в обмен на OH^- с помощью *переносчика пирувата.* Взаимный обмен глутамата и аспартата осуществляет *переносчик глутамата*, способный также переносить OH^-. Митохондрии содержат и *систему транспорта ионов кальция.* Непосредственным источником свободной энергии для накопления Ca^{2+} в митохондриальном матриксе является не ATP, а протонодвижущая сила, генерируемая переносом электронов.

14.12. Полное окисление глюкозы дает 36 ATP

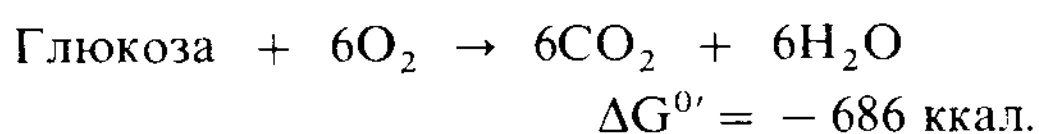
Теперь мы можем рассчитать количество ATP, образующееся при полном окислении глюкозы (табл. 14.4). Суммарная реакция:



$$\text{Глюкоза} + 36\text{ADP} + 36P_i + 36\text{H}^+ + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 36\text{ATP} + 42\text{H}_2\text{O}.$$

Отношение P : O равно 3, поскольку образуется 36 молекул ATP, а потребляется 12 атомов кислорода. Бо́льшая часть ATP, 32 молекулы из 36, генерируется путем окислительного фосфорилирования.

Общая эффективность генерирования ATP достигает высокого уровня. При окислении глюкозы при стандартных условиях высвобождается 686 ккал:



$$\text{Глюкоза} + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \qquad \Delta G^{0\prime} = -686 \text{ ккал}.$$

Свободная энергия, запасенная в 36 ATP, составляет 263 ккал, поскольку $\Delta G^{0\prime}$ для гидролиза ATP равно −7,3 ккал. Отсюда термодинамическая эффективность образования ATP из глюкозы достигает при стандартных условиях 263/686, или 38%.

Дыхательный коэффициент (RQ), часто используемый показатель при исследованиях метаболизма на целом организме, определяется следующим путем:

$$RQ = \frac{\text{Число молей образующегося } CO_2}{\text{Число молей поглощаемого } O_2}.$$

Для полного окисления углеводов RQ равен 1. Для жиров и белков он составляет соответственно 0,71 и 0,80. Таким образом, RQ может быть использован как показатель относительного использования организмом углеводов, жиров и белков.

Таблица 14.4. **Выход ATP при полном окислении глюкозы**

Последовательность реакций	Выход ATP на 1 глюкозу
Гликолиз: превращение глюкозы в пируват (в цитозоле)	
Фосфорилирование глюкозы	−1
Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата	−1
Дефосфорилирование 2 молекул 1,3-БФГ	+2
Дефосфорилирование 2 молекул фосфоенолпирувата	+2
2 NADH образуются при окислении 2 молекул глицеральдегид-3-фосфата	
Превращение пирувата в ацетил-СоА (в митохондриях)	
Образуются 2 NADH	
Цикл трикарбоновых кислот (в митохондриях)	
2 молекулы гуанозинтрифосфата образуются из 2 молекул сукцинил-СоА	
6 NADH образуются при окислении 2 молекул изоцитрата, α-оксоглутарата и малата	
2 $FADH_2$ образуются при окислении 2 молекул сукцината	
Окислительное фосфорилирование (в митохондриях)	
2 NADH образуются при гликолизе, каждый дает 2 ATP (при условии, что транспорт NADH осуществляется путем глицеролфосфатного челночного механизма)	+4
2 NADH образуются при окислительном декарбоксилировании пирувата; каждый дает 3 ATP	+6
2 $FADH_2$ образуются в цикле трикарбоновых кислот; каждый дает 2 ATP	+4
6 NADH образуются в цикле трикарбоновых кислот; каждый дает 3 ATP	+18
ОБЩИЙ ВЫХОД НА ОДНУ МОЛЕКУЛУ ГЛЮКОЗЫ	+36

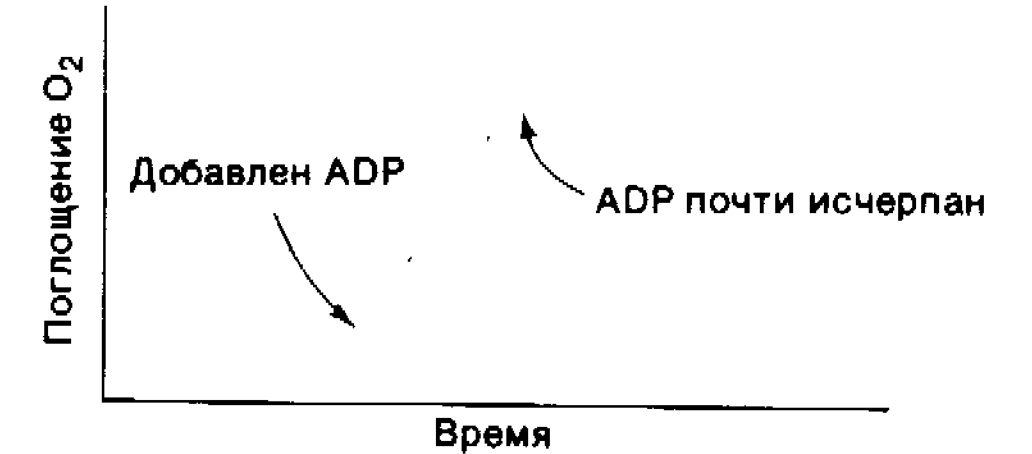


Рис. 14.12. Дыхательный контроль. Электроны переносятся на O_2 только при условии фосфорилирования ADP в ATP.

4.13. Скорость окислительного фосфорилирования определяется по потребности в ATP

При большинстве физиологических состояний перенос электронов тесно сопряжен с фосфорилированием. *Электроны обычно переносятся по электронтранспортной цепи лишь при условии одновременного фосфорилирования ADP в ATP.* Окислительное фосфорилирование требует поступления NADH (или другого источника электронов с высоким потенциалом), O_2, ADP и P_i. Наиболее важным фактором в определении скорости окислительного фосфорилирования является *содержание ADP.* При добавлении ADP скорость поглощения кислорода тканевым гомогенатом значительно возрастает и затем, когда весь добавленный ADP превратится в ATP, возвращается к исходному уровню (рис. 14.12).

Регуляция скорости окислительного фосфорилирования содержанием ADP называется *дыхательным контролем.* Физиологическое значение этого регуляторного механизма очевидно. Содержание ADP возрастает при потреблении ATP, и, таким образом, окислительное фосфорилирование оказывается сопряженным с использованием ATP. *При отсутствии потребности в синтезе ATP переноса электронов от топливных молекул на O_2 не происходит.*

14.14. Динитрофенол разобщает окислительное фосфорилирование путем разрушения протонного градиента

Тесное сопряжение между переносом электронов и фосфорилированием нарушается под действием 2,4-динитрофенола (ДНФ) и некоторых других кислотных ароматических соединений (рис. 14.13). Эти соединения переносят протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану. Перенос электронов от NADH к O_2 в присутствии таких разобщителей протекает нормально, но образования ATP митохондриальной ATPазой не происходит, поскольку исче-





Рис. 14.13. Формулы двух разобщителей окислительного фосфорилирования. Эти растворимые в липидах соединения могут переносить протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану. Отщепляющийся протон показан красным цветом.

зает протонодвижущая сила, обусловливающая перенос протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Потеря дыхательного контроля приводит к тому, что поглощение O_2 и окисление NADH повышается. В то же время ДНФ не оказывает влияния на субстратное фосфорилирование. В силу своего специфического действия на дыхательную цепь ДНФ и другие разобщители служат ценным инструментом при исследованиях обмена веществ.

Разобщение окислительного фосфорилирования может быть биологически полезным. *Оно представляет собою способ генерирования тепла для поддержания температуры тела у зимнеспящих животных, у некоторых новорожденных животных и у млекопитающих, адаптированных к холоду.* Для этого процесса *термогенеза* специализирована бурая жировая ткань, очень богатая митохондриями. В качестве разобщителей в ней выступают жирные кислоты, высвобождение которых в свою очередь регулируется норадреналином. Таким образом, степень разобщения окислительного фосфорилирования в бурой жировой ткани находится под гормональным контролем. Митохондрии в этой ткани могут выполнять функцию генераторов АТР, или миниатюрных обогревательных печей.

Существует интересное сообщение о 38-летней женщине, которая была не в состоянии выполнять продолжительную физическую работу. Основной обмен у нее более чем вдвое превышал нормальный уровень, но функция щитовидной железы не была нарушена. Биопсия мышцы показала, что митохондрии в ней очень многообразны и атипичны по структуре. При биохимических исследованиях выяснилось, что эти митохондрии не подвержены дыхательному контролю. NADH в них окислялся независимо от присутствия ADP. Другими словами, в них *отсутствовало тесное сопряжение окисления и фосфорилирования.* Отношение P : O было ниже нормы. Таким образом, у этой больной значительная часть энергии топливных молекул превращалась не в АТР, а в тепло. Природа молекулярного дефекта в таких митохондриях пока не расшифрована.

14.15. Трехмерная структура цитохрома *c*

Цитохром *c* – единственный из белковых переносчиков электронов, который можно путем мягкой обработки отделить от внутренней митохондриальной мембраны. Растворимость этого периферического мембранного белка в воде облегчает его очистку и кристаллизацию. Действительно, о структуре цитохрома *c* известно значительно больше, чем о структуре какого-либо другого белка - переносчика электронов.

Цитохром *c* состоит из одной 104-членной полипептидной цепи и присоединенной к ней ковалентно группы гема. Трехмерную структуру ферро- и ферриформ цитохрома *c* раскрыл Ричард Дикерсон (Richard Dickerson) с разрешением, близким к атомному (рис. 14.14). Белок имеет почти сферическую форму диаметром 34 Å. Группа гема окружена многочисленными плотноупакованными гидрофобными боковыми цепями. Атом железа связан с атомом серы остатка метионина и с атомом азота остатка гистидина (рис. 14.15). Гидрофобный характер окружения гема обусловливает большее положительное значение окислительно-восстановительного потенциала цитохрома *c* (соответствующее более высокому сродству к электронам), чем в случае того же самого комплекса гема в водной среде. Удаление электрона из гема в составе цитохрома *c* является энерге-

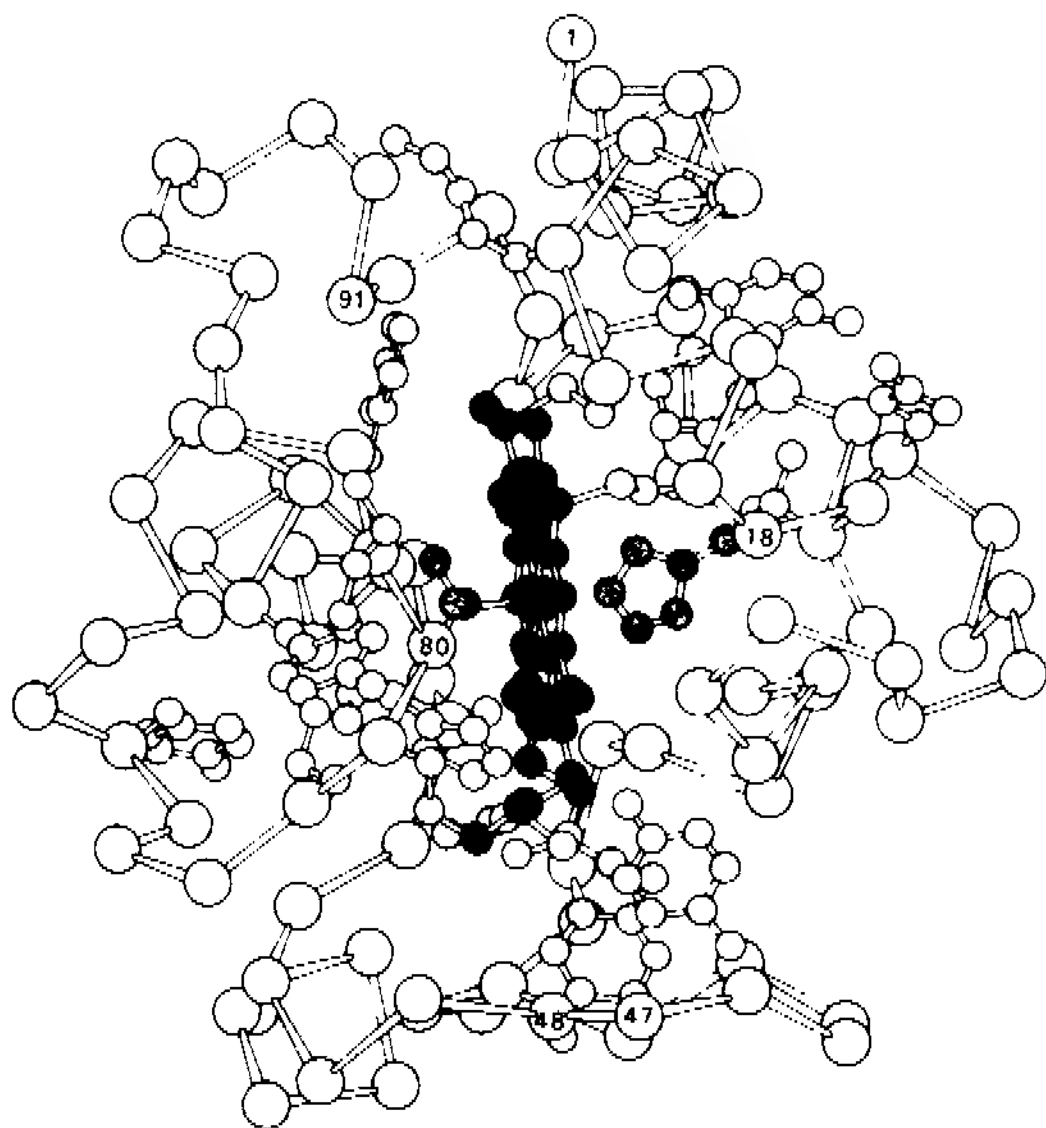


Рис. 14.14. Трехмерная структура восстановленного цитохрома *c* тунца. Показаны группа гема (окрашено красным), метионин-80 (окрашено синим), гистидин-18 (окрашено синим) и α-углеродные атомы [Takano T., Kallai O. B., Swanson R., Dickerson R. E., J. Biol. chem., **248**, 5244 (1973).]

тически менее выгодным, чем его удаление из гема в воде, потому что в цитохроме *c* диэлектрическая постоянная вблизи атома железа ниже.

Общая структура молекулы может быть охарактеризована как оболочка толщиной в один остаток, плотно окружающая гем. Гидрофобные боковые цепи образуют внутреннюю часть оболочки. Далее идет главная цепь, за ней следуют несущие заряд боковые цепи, которые размещаются на поверхности. Имеется очень маленькая α-спираль, β-складчатые слои отсутствуют. По существу полипептидная цепь обернута вокруг гема. Остатки с 1-го по 47-й находятся со стороны гистидина-18 группы гема (названной правой стороной), остатки с 48-го по 91-й – на стороне метионина-80 (названной левой стороной). Остатки с 92-го по 104-й идут обратно через гем на его правую сторону.

14.16. Взаимодействие цитохрома *c* с его редуктазой и оксидазой

Как уже указывалось ранее, цитохром *c* переносит электроны от QH_2-цитохром-*c*—редуктазного комплекса (второй запасающий энергию участок) к цитохром-*c*—оксидазному комплексу (третий запасающий энергию участок). Как взаимодействует цитохром *c* со своей редуктазой и затем со своей оксидазой? Важным подходом к разрешению этого вопроса является изучение распределения заряженных остатков на поверхности белка. В молекулах цитохрома *c* всех изученных до сих пор видов имеются кластеры лизиновых боковых цепей вокруг гемовой щели на одной поверхности белка (передняя часть рис. 14.14). *Распределение зарядов на поверхности цитохрома c, по всей вероятности, играет определенную роль в распознавании и связывании редуктазы и оксидазы.* Например, взаимодействие цитохрома *c* с цитохромоксидазой нарушается при модификации лизина-13. Кроме того, полилизин конкурирует с цитохромом *c* за связывание с обоими ферментами.

Каким образом цитохром *c* акцептирует с редуктазы электроны, которые он затем отдает оксидазе? A priori здесь возможны два механизма. Перенос электронов между группами гема различных белков может осуществляться ароматическими боковыми цепями. Другая возможность – это прямой перенос электрона от одного гема к другому. Важно отметить, что электрон, переносимый гемом, не обязательно тяготеет к его атому железа. Он скорее частично делокализован над всей конъюгированной π-электронной сетью ге-

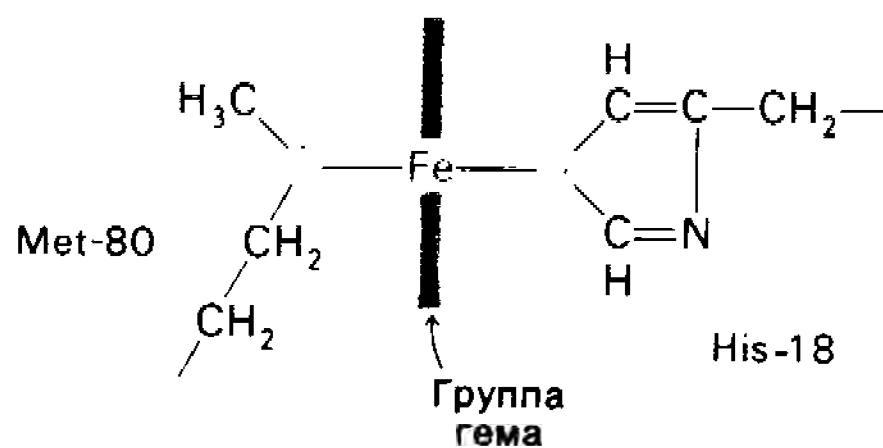


Рис. 14.15. Атом железа гемовой группы в цитохроме *c* связан с метиониновой и гистидиновой боковой цепью.

ма. Следовательно, электрон может переноситься от одного гема к другому, если их края достаточно сближены (отстоят менее чем на 8 Å) и их плоскости примерно параллельны. Прямой механизм переноса электрона представляется более вероятным из-за очень большой величины свободной энергии, требуемой для образования свободнорадикального аниона ароматической боковой цепи. Кроме того, один из краев гема в цитохроме *c* (передний край на рис. 14.14) доступен для прямых реакций, участвующих в переносе электронов.

14.17. Конформация цитохрома *c* оставалась в основном постоянной в течение миллиардов лет

Цитохром *c* имеется у всех организмов, обладающих митохондриальными дыхательными цепями: растений, животных и эукариотических микроорганизмов. Этот переносчик электронов возник более 1,5 млрд. лет назад, до того, как произошла дивергенция на царство растений и животных. Его функция сохранялась неизменной в течение всего этого периода, о чем свидетельствует тот факт, *что цитохром c любого вида эукариот реагирует in vitro с цитохромоксидазой любого другого исследованного к настоящему времени вида.* Например, цитохром *c* из зародышей пшеницы реагирует с цитохромоксидазой из ткани человека. Второй критерий сохранения функции – близость значений окислительно-восстановительного потенциала для всех молекул цитохрома *c* (около + 0,25 В). Третий критерий – почти полная идентичность спектров поглощения молекул цитохрома *c* различных видов. Действительно, цитохромы некоторых прокариот, такие, как цитохром c_2 фотосинтезирующих бактерий и цитохром c_{550} денитрифицирующих бактерий, очень близки к цитохрому *c* из митохондрий сердца тунца (рис. 14.16).

Эмиль Смит, Эмануэль Марголиаш (Emil Smith, Emanuel Margoliash) и др. определяли аминокислотную последовательность цитохромов *c* от более чем восьми далеких друг от друга видов эукариот. Они обнаружили поразительный факт – оказалось, что *26 из 104 остатков сохранялись инвариантными в течение более полу-*

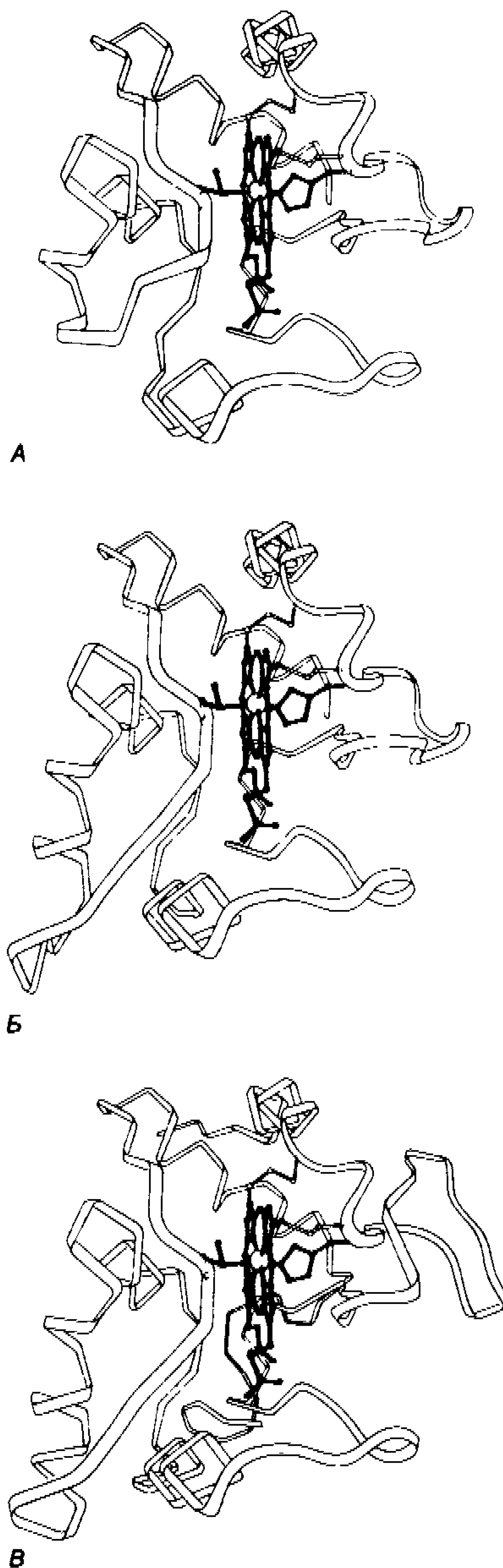


Рис. 14.16. Сохранение трехмерной структуры цитохрома *c* в ходе эволюции на примере сходства конформаций цитохрома *c* из митохондрий сердечной мышцы тунца (*А*), цитохрома c_2 из *Rhodospirillum rubrum*, фотосинтезирующей бактерии (*Б*) и цитохрома c_{550} из *Paracoccus denitrificans*, денитрифицирующей бактерии (*В*). (Salamme, Воспроизведено по разрешению из Annual Review of Biochemistry, v. 46, 1977, Annual Rewiews Inc.)

тора миллиардов лет эволюции. Теперь, когда известна пространственная структура молекулы, становятся очевидными причины такого постоянства большинства из этих остатков. Как можно было ожидать, инвариантными являются гемовые лиганды метионин-80 и гистидин-18, так же как два цистеина, ковалентно связанные с гемом. Последовательность из 11 остатков (с 70-го по 80-й) почти одинакова во всех молекулах цитохрома *c*. Инвариантны многие гидрофобные остатки, контактирующие с гемом. В ходе эволюции в цитохроме *c* сохранилась большая часть остатков глицина. Как указывалось ранее (разд. 9.6), остатки глицина имеют важное значение в силу их малых размеров. Компактное скручивание пептидной цепи требует присутствия глицина в определенных положениях. Некоторые инвариантные остатки лизина и аргинина локализованы в положительно заряженных кластерах на поверхности молекулы. Один из таких кластеров взаимодействует с цитохром-*c*—редуктазой, другой – с цитохромоксидазой.

14.18. Передача протонодвижущей силы протонными градиентами - центральный мотив биоэнергетики

Основная концепция, представленная в этой главе, состоит в том, что митохондриальный перенос электронов и синтез ATP связаны трансмембранным протонным градиентом. Синтез ATP в бактериях и хлоропластах (разд. 19.13) также запускается протонными градиентами. Протонный градиент является движущей силой множества процессов, идущих с потреблением энергии, таких, как активный транспорт Ca^{2+} митохондриями, поступление некоторых аминокислот и сахаров в бактерии, вращение бактериальных жгутиков и перенос электронов от NADH к NADPH. Протонные градиенты могут быть также использованы для генерирования тепла, например при зимней спячке. Очевидно, что *протонные градиенты занимают центральное место во взаимопревращениях одного вида энергии в другой* (рис. 14.17).

Почему для этой роли в ходе эволюции пал выбор на протонные градиенты? Митчелл (1976) предлагает следующее объяснение:

> Преобразование энергии путем тока протонов изумительно просто и эффективно, поскольку все, что для этого требуется, это тонкая топологически замкнутая изолированная липидная мембрана между двумя проводящими протон водными фазами. Генератор протонного тока, приложенный через мембрану в любой ее точке, действует как источник протонодвижущей силы, которая может быть «оттянута» подходящим потребителем в любой другой точке мембраны, даже когда производитель и потребитель отстоят совсем далеко друг от друга на молекулярной шкале. Эта хемиосмотическая система передачи

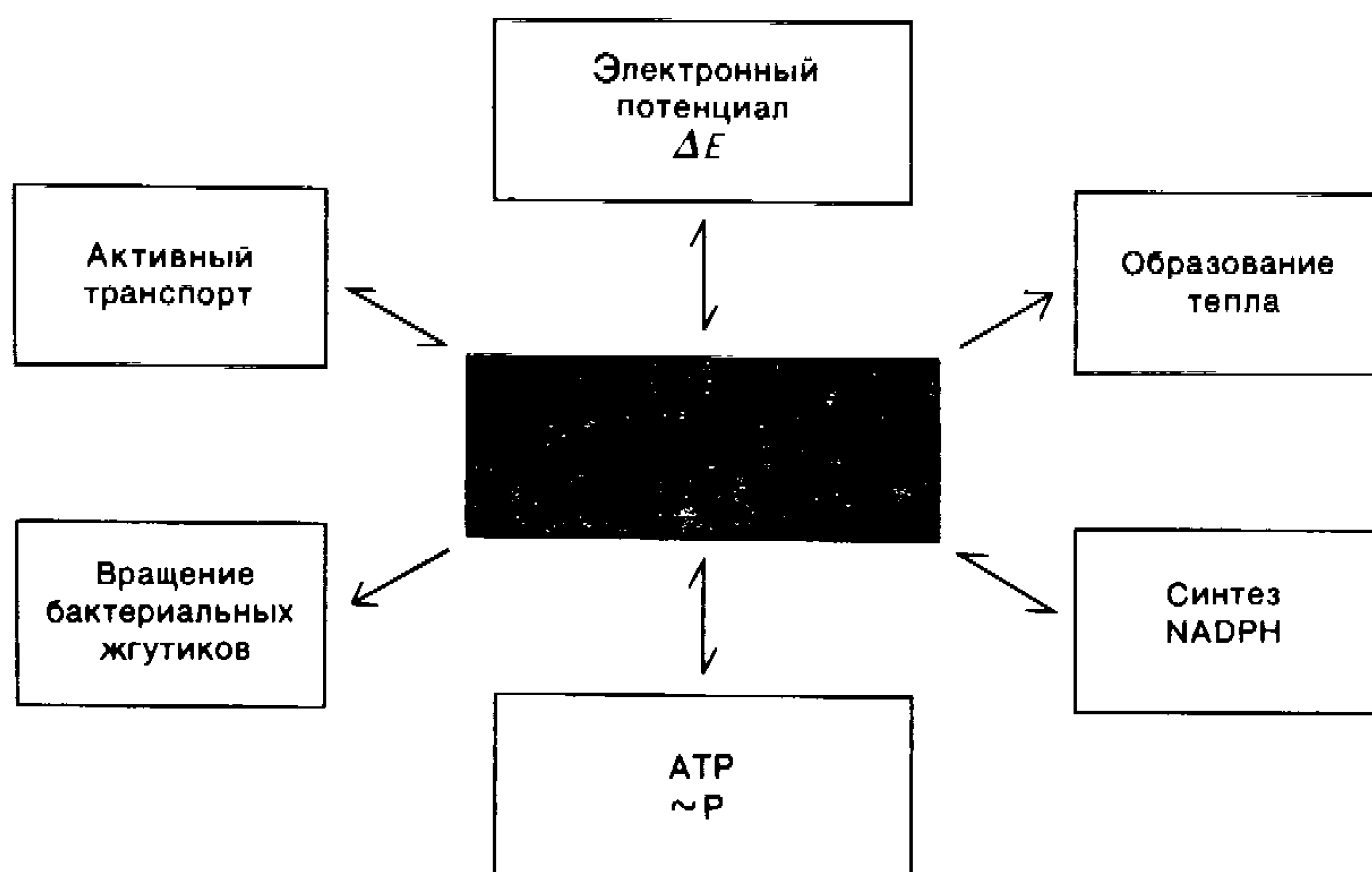


Рис. 14.17. Протонный градиент взаимопревращающаяся форма свободной энергии.

протонодвижущей силы в биологии хорошо знакома электрофизиологам, изучающим животные плазматические мембраны, передача протонодвижущей силы, через которые осуществляется при помощи градиентов активности ионов Na^+ и K^+ (например, при проведении нервного импульса или при всасывании питательных веществ в кишечнике). Однако из-за относительно высокой реакционной способности и мобильности протона, обеспечивающих его функционирование при очень низких концентрациях, 'использование потока протонов для передачи протонодвижущей силы явление в биологии уникальное по его повсеместному распространению и широкому диапазону применения... Поучительно вспомнить, что эти микроминиатюрные *протонные* устройства возникли в силу случая и развились до стадии изумительного совершенства путем естественного отбора за миллионы лет до того, как успехи новой технологии привели к изобретению микроминиатюрных *электронных* устройств. Раскрытие детальных механизмов природных протонных систем может, таким образом, предоставить пищу для размышлений и догадок не только биохимикам в их теоретических изысканиях, но и технологам в их изобретениях.

Заключение

При окислительном фосфорилировании протонный градиент через внутреннюю митохондриальную мембрану обеспечивает сопряжение синтеза ATP с током электронов от NADH или $FADH_2$ к O_2. Ток электронов через три асимметрично ориентированных трансмембранных комплекса приводит к выбросу протонов из митохондриального матрикса и генерированию мембранного потенциала. Синтез ATP происходит при обратном токе протонов в матрикс через канал в АТР-синтезирующем комплексе, который известен как митохондриальная АТРаза. Окислительное фосфорилирование воплощает основную концепцию биоэнергетики: передачу свободной энергии при помощи протонных градиентов.

Переносчиками электронов в дыхательном ансамбле внутренней митохондриальной мембраны служат флавины, железосерные комплексы, хиноны и группы гема цитохромов. Электроны от NADH переносятся на FMN-простетическую группу NADH-Q -редуктазы, первого из трех комплексов. Эта редуктаза содержит также Fe-S-центры. Электроны появляются в QH_2, восстановленной форме убихинона (Q). QH_2, очень мобильный переносчик, транспортирует свои электроны к QH_2-цитохром-*c*—редуктазе, комплексу, содержащему цитохромы *b* и c_1 и Fe-S-центр. Этот второй комплекс восстанавливает цитохром *c*, водорастворимый периферический мембранный белок. Цитохром *c*, подобно Q, является мобильным переносчиком электронов, которые затем транспортируются к цитохром-*c*—оксидазе, представляющей собою третий комплекс, содержащий цитохромы *a* и a_3. Ион меди в этой оксидазе переносит электроны к конечному акцептору O_2 с образованием H_2O.

При токе двух электронов через каждый из указанных трех комплексов происходит генерирование протонного градиента, достаточного для синтеза одной молекулы ATP. Таким образом, на один окисленный NADH образуются три ATP, а на один окисленный $FADH_2$ – только два ATP, потому что его электроны включаются в цепь на стадии QH_2, после первого этапа выброса протонов. Точно так же только два ATP генерируются при окислении NADH, образовавшегося в цитозоле, поскольку один ATP теряется в ходе переноса электронов в митохондрии глицеролфосфатным челночным механизмом. Поступление ADP в митохондрии сопряжено с выходом ATP в процессе так называемой облегченной обменной диффузии. При полном окислении молекулы глюкозы до CO_2 и H_2O образуются 36 молекул ATP. Перенос электронов в норме тесно сопряжен с фосфорилированием. Окисление NADH и $FADH_2$ происходит только при условии одновременного фосфорилирования ADP в ATP. Это сопряжение, называемое дыхательным контролем, может быть нарушено разобщителями, такими, как ДНФ, который нарушает протонный градиент, перенося протоны через внутреннюю митохондриальную мембрану.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Hinkle P.C., McCarty R.E., 1978. How cells make ATP, Sci. Amer., **238(3)**, 104–123.

Mitchell P., 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, Science, **206**, 1148–1159. (Обзор Митчелла по эволюции хемиосмотической гипотезы, представленный в его Нобелевской лекции.)

Stoeckenius W., 1976. The purple membrane of saltloving bacteria, Sci. Amer., **234(6)**, 38–46.

Dickerson R.E., 1972. The structure and history of an ancient protein, Sci. Amer., **226(4)**, 58–72. (Прекрасно иллюстрированный очерк по конформации и эволюции цитохрома *c*.)

Dickerson R.E., 1980. Cytochrome *c* and the evolution of energy metabolism, Sci. Amer., **242(3)**, 137–153.

Книги

Racker E., 1976. A New Look at Mechanisms in Bioenergetics, Academic Press. (Живая, личная оценка автором проблем переноса электронов и фосфорилирования.) [Имеется перевод: Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды.–М.: Мир, 1979.]

Quagliariello E., Papa S., Palmieri F., Slater E.C., Siliprandi N. (eds.), 1975. Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation, Academic Press.

Lovenberg W. ed.), 1977. Iron-sulfur proteins, vol. 3, Academic Press.

Обзоры

Boyer P.D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E.C., 1977. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation, Ann. Rev. Biochem., **46**, 955–1026. (Серия обзорных статей, вводящих исследователей в данную область. Начать целесообразно с обзора Эрнстера.)

Fillingame R., 1980. The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation, Ann. Rev. Biochem., **49**, 1079–1114.

Downie J.A., Gibson F., Cox G.B., 1979. Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells, Ann. Rev. Biochem., **48**, 103–131.

DePierre J.W., Ernster L., 1977. Enzyme topology of intracellular membranes, Ann. Rev. Biochem., **6**, 201–262. (Обзор по локализации на определенной стороне мембраны дыхательной цепи, АТРазы и других белков внутренней митохондриальной мембраны.)

Salemme F.R., 1977. Structure and function of cytochromes *c*, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 299–329.

Beinert H., 1977. Iron-sulfur centers of the mitochondrial electron transfer system. In: Lovenberg W. (ed.), Iron-sulfur proteins, vol. 3, pp. 61–100, Academic Press.

Sweeney W.V., Rabinowitz J.C., 1980. Proteins containing 4Fe–4S clusters: an overview, Ann. Rev. Biochem., **49**, 139–161.

Crane F.L, 1977. Hydroquinone dehydrogenases, Ann. Rev. Biochem., **46**, 439–469.

Статьи

Racker E., Stoeckenius W., 1974. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation, J. Biol. Chem., **249**, 662–663.

Mitchell P., 1976. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity, Trans. Biochem. Soc., **4**, 399–430.

Yoshida M., Okamoto H., Sone N., Hirata H., Kagawa Y., 1977. Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits, Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 936–940.

Skulachev V.P. (Скулаев В.П.), 1977.Transmembrane electrochemical H^+-potential as a convertible energy source for the living cell. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett, *74*, 1–9.

Luft R., Ikkos D., Palmieri G., Ernster L, Afzelius B., 1962. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphological study, J. Clin. Invest., **41**, 1776–1804.

Erecinska M., Wilson D.F., Nishiki K., 1978. Homeostatic regulation of cellular energy metabolism: experimental characterization in vivo and fit to a model, Amer. J. Physiol., **234**, 82–89.

Исторические аспекты

Racker E., 1980. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics, Fed. Proc., **39**, 210–215.

Keilin D., 1966. The History of Cell Respiration and Cytochromes, Cambridge University Press.

Kalckar H.M. (ed.), 1969. Biological Phosphorylations: Development of Concepts, Prentice-Hall. (Сборник классических работ по окислительному фосфорилированию и другим аспектам биоэнергетики.)

Fruton J.S., 1972. Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology. Wiley-Interscience. (Включает прекрасный анализ клеточного дыхания, начинающийся на с. 262.)

Вопросы и задачи

1. Каков выход АТР при полном окислении клеточным гомогенатом каждого из нижеследующих субстратов, если принять, что гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование полностью активны?

а) Пируват.
б) NADH.
в) Фруктозо-1,6-бисфосфат.
г) Фосфоенолпируват.
д) Глюкоза.
е) Дигидроксиацетонфосфат.

2. а) Напишите уравнение для окисления восстановленного глутатиона за счет O_2 (разд. 15.11). Рас-

считайте $\Delta E'_0$ и $\Delta G^{0'}$ для этой реакции, используя данные табл. 14.1.

б) Каковы значения $\Delta E'_0$ и $\Delta G^{0'}$ для восстановления окисленного глутатиона за счет NADPH?

3. Как действует каждый из нижеследующих ингибиторов на перенос электронов и образование ATP в дыхательной цепи?

а) Азид.

б) Атрактилозид.

в) Ротенон.

г) ДНФ.

д) Оксид углерода.

е) Антимицин А.

4. Добавление к митохондриям олигомицина вызывает снижение как переноса электронов от NADH к O_2, так и скорости образования ATP. Последующее добавление ДНФ приводит к увеличению скорости переноса электронов без сопутствующего изменения скорости образования ATP. Какую реакцию ингибирует олигомицин?

5. Сравните значения $\Delta G^{0'}$ для окисления сукцината с участием NAD^+ и FAD. Используйте данные табл. 14.1 и примите, что $\Delta E'_0$ для окислительно-восстановительной пары $FAD/FADH_2$ близко к 0 В. Почему FAD, а не NAD^+ служит акцептором электронов при реакции, катализируемой сукцинат-дегидрогеназой?

6. Немедленное введение нитрита оказывает очень эффективное лечебное действие при отравлении цианидом. Какова основа действия этого антидота? (Подсказка: нитрит окисляет феррогемоглобин в ферригемоглобин.)

7. Каково максимальное значение отношения $[ATP]/[ADP][P_i]$, совместимое с синтезом ATP, для протонодвижущей силы 0,2 В (матрикс отрицателен)? При расчете этого отношения примите, что количество транслоцируемых протонов составляет 2, 3 и 4 в расчете на одну молекулу образующегося ATP и что температура равна 25°С.

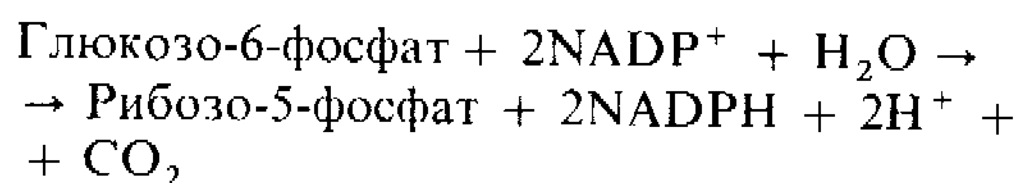
ГЛАВА 15

Пентозофосфатный путь и глюконеогенез

В предыдущих главах, посвященных гликолизу, циклу трикарбоновых кислот и окислительному фосфорилированию, преимущественно рассматривалось генерирование ATP с использованием глюкозы в качестве исходного топлива. Теперь мы обратимся к генерированию другого типа метаболической энергии – восстановительной способности. Некоторая часть электронов и атомов водорода топливных молекул используется для биосинтетических целей, а не переносится на O_2 с генерированием ATP. Легкодоступным источником восстановительного эквивалента в клетках является *NADPH*, отличающийся от NADH наличием фосфорильной группы при С-2 одного из рибозных компонентов. Как упоминалось ранее (разд. 11.9), существует *фундаментальное различие между ролью NADPH и NADH в большинстве биохимических реакций. NADH окисляется дыхательной цепью с сопутствующим генерированием ATP, тогда как NADPH служит донором водорода и электронов при восстановительных биосинтезах.* В данной главе рассматривается также процесс, называемый *глюконеогенезом* – синтез глюкозы из неуглеводных предшественников.

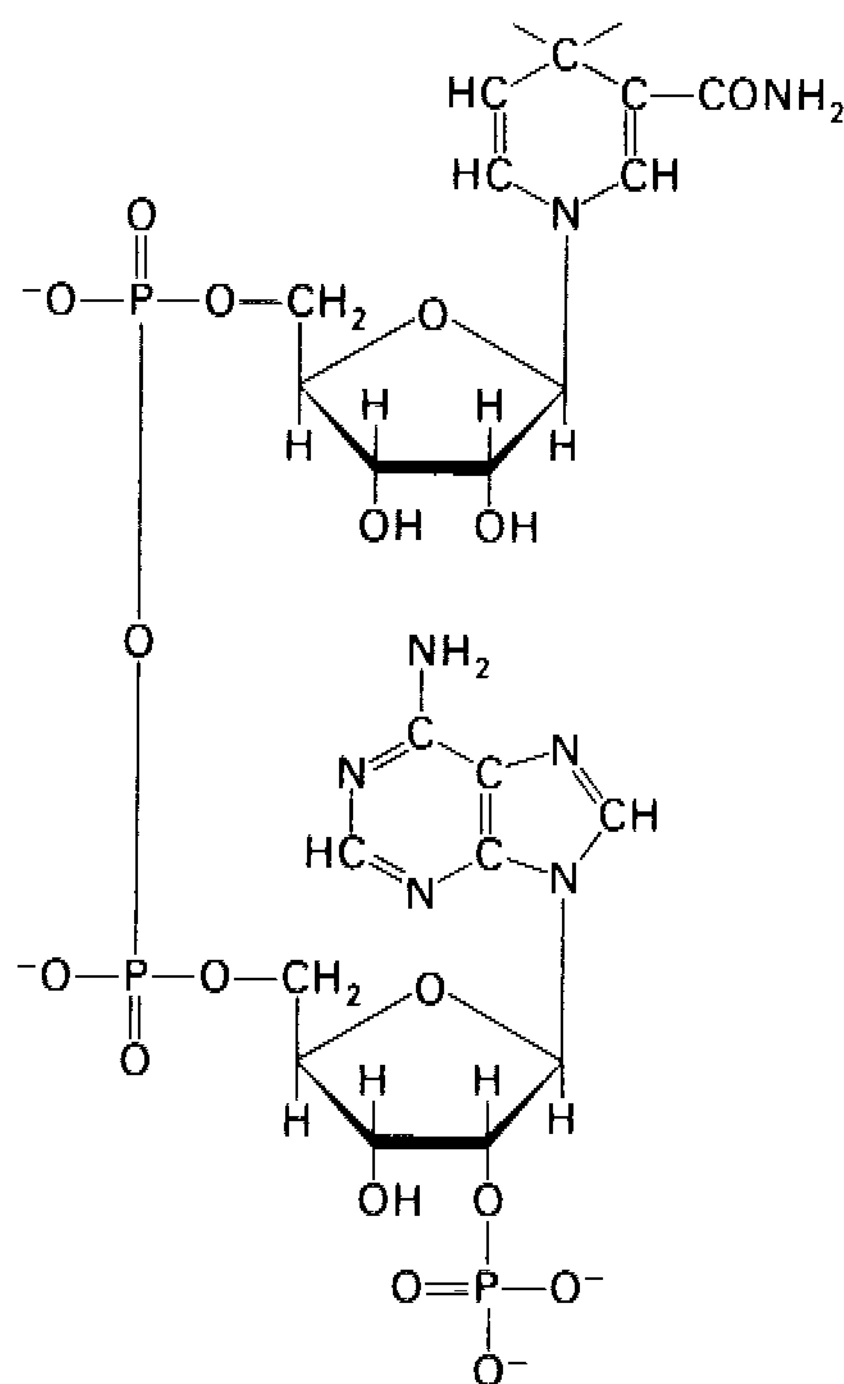
15.1. Пентозофосфатный путь генерирует ATP и синтезирует пятиуглеродные сахара

В пентозофосфатном пути генерирование NADPH происходит при окислении глюкозо-6-фосфата в рибозо-5-фосфат. Этот пятиуглеродный сахар и его производные являются компонентами таких важных биологических молекул, как ATP, CoA, NAD^+, FAD, РНК и ДНК.



$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + 2NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{Рибозо-5-фосфат} + 2NADPH + 2H^+ + CO_2$$

Пентозофосфатный путь калализирует также и ряд неокислительных реакций, обеспечивающих взаимопревращения трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродных сахаров. Все эти процессы происходят в цитозоле. У растений часть реакций пентозофосфатного пути участвует также в образовании гексоз из CO_2 при фотосинтезе (гл. 19).



Восстановленный никотинамидаденин-динуклеотидфосфат (NADPH)

Пентозофосфатный путь называют иног-

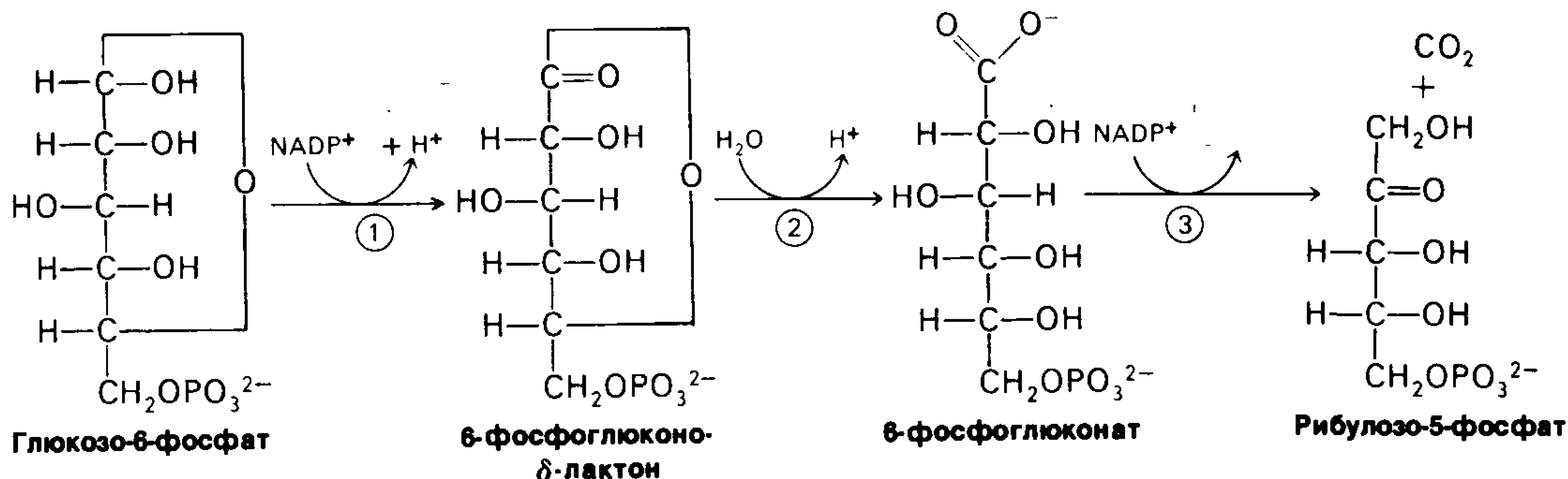


Рис. 15.1. Окислительная ветвь пентозофосфатного пути. Эти три реакции катализируются глюкозо-6-фосфат – дегидрогеназой, лактоназой и 6-фосфоглюконат – дегидрогеназой.

да *пентозным шунтом, гексозомонофосфатным путем* или *фосфоглюконатным окислительным путем.* Открытие Отто Варбургом (Otto Warburg) в 1931 г. глюкозо-6-фосфат – дегидрогеназы, первого фермента этого пути, сделало возможной его полную расшифровку, которую осуществили Фриц Липман, Фрэнк Дикенс, Бернард Хорекер и Эфроим Рэкер (Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker, Efraim Racker).

15.2. Две молекулы NADPH генерируются при превращении глюкозо-6-фосфата в рибулозо-5-фосфат

Пентозофосфатный путь начинается с дегидрирования глюкозо-6-фосфата при С-1, реакции, катализируемой *глюкозо-6-фосфат – дегидрогеназой* (рис. 15.1). Фермент высокоспецифичен в отношении $NADP^+$; K_M для NAD^+ примерно в тысячу раз выше, чем для $NADP^+$. Продуктом реакции является *6-фосфоглюконо-δ-лактон*, внутримолекулярный эфир, с эфирной связью между С-1-карбоксильной группой и гидроксилом при С-5. Следующий этап – гидролиз 6-фосфоглюконо-δ-лактона специфической *лактоназой*, дающий *6-фосфоглюконат.* Этот шестиуглеродный сахар подвергается затем окислительному декарбоксилированию *6-фосфоглюконат – дегидрогеназой* с образованием *рибулозо-5-фосфата.* Акцептором электронов вновь служит $NADP^+$.

15.3. Рибулозо-5-фосфат изомеризуется в рибозо-5-фосфат с образованием ендиола в качестве промежуточного продукта

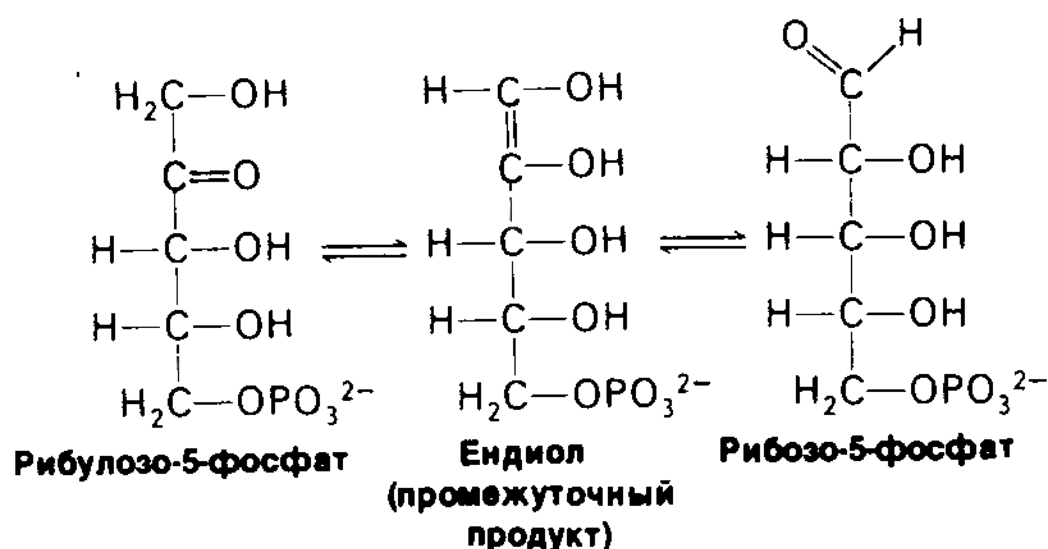
Конечным этапом синтеза рибозо-5-фосфата является изомеризация рибулозо-5-фосфата *фосфопентозо-изомеразой.* Эта реакция подобна гликолитическим реакциям:

Глюкозо-6-фосфат ⇌ Фруктозо-6-фосфат

и

Дигидроксиацетонфосфат ⇌ Глицеральдегид-3-фосфат.

Все три кетозо-альдозные изомеризации идут через образование ендиольного промежуточного продукта.



15.4. Пентозофосфатный путь и гликолиз связаны между собой транскетолазой и трансальдолазой

В предыдущих реакциях образовывались две молекулы NADPH и одна молекула рибозо-5-фосфата на каждую окисленную молекулу глюкозо-6-фосфата. Однако многие клетки нуждаются для восстановительных биосинтезов в большем количестве NADPH, чем требуется для включения рибозо-5-фосфата в нуклеотиды и нуклеиновые кислоты. В таких случаях рибозо-5-фосфат превращается в глицеральдегид-3-фосфат и фруктозо-6-фосфат под действием *транскетолазы* и *трансальдолазы. Эти ферменты создают обратимую связь между пентозофосфатным пу-*

тем и гликолизом, катализируя следующие три реакции:



Суммарный выход трех реакций – *образование двух гексоз и одной триозы из трех пентоз.*

Смысл этих процессов состоит в *переносе двухуглеродного фрагмента транскетолазой и трехуглеродного фрагмента – трансальдолазой*. Сахаром-донором двух-

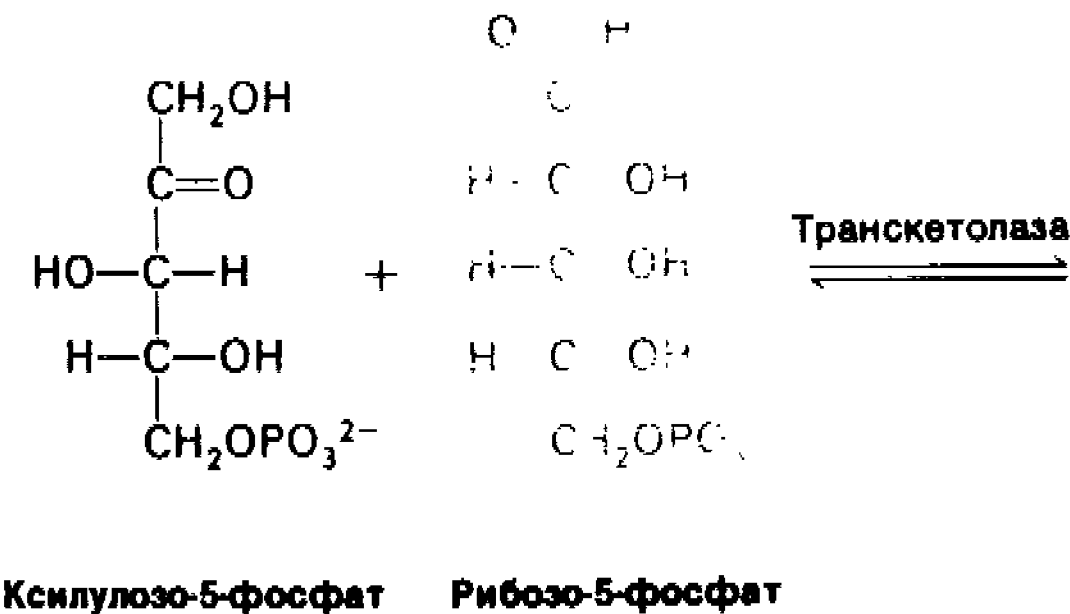


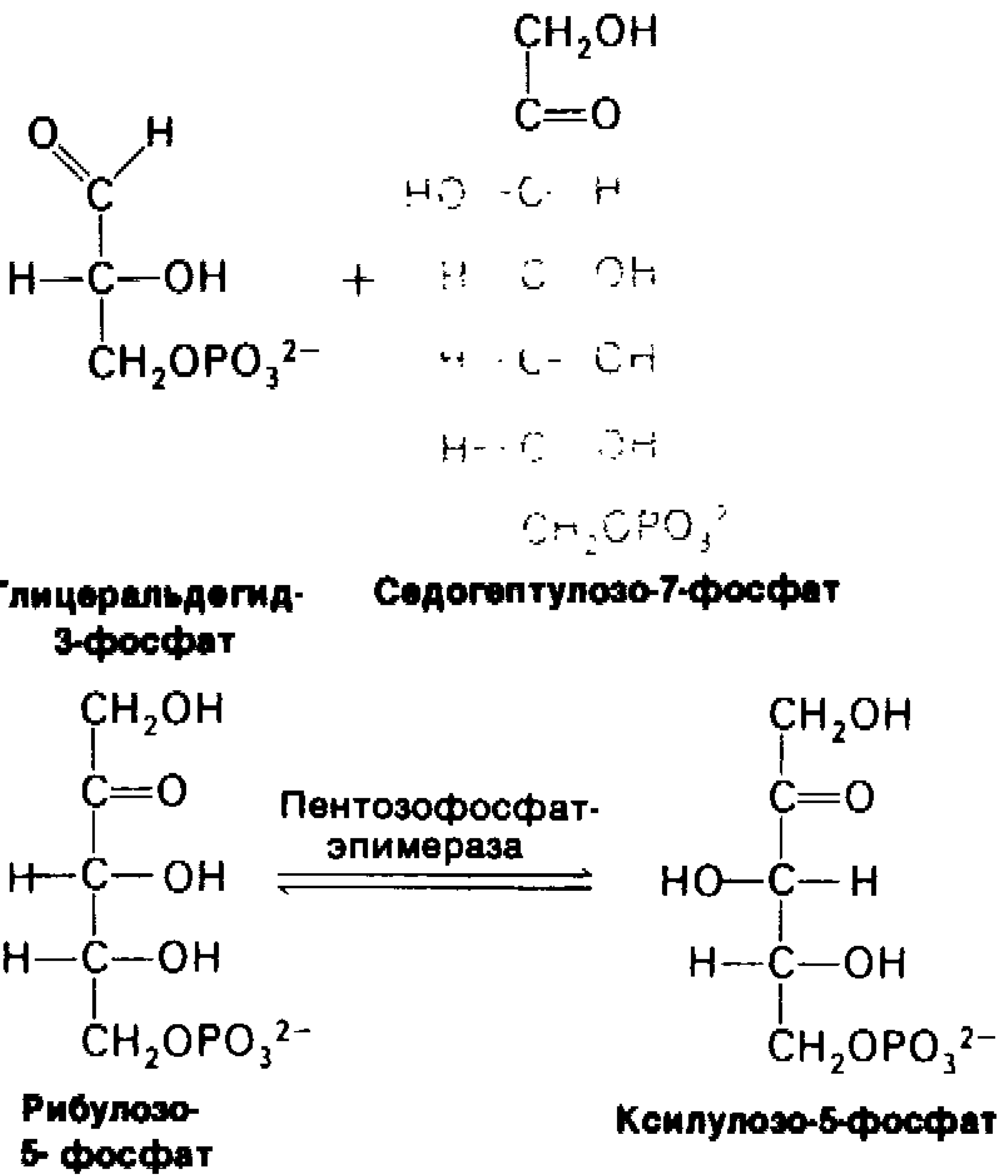
и трехуглеродных фрагментов служит обычно кетоза, а акцептором – альдоза.

Первая из трех реакций, связывающих пентозофосфатный путь и гликолиз, представляет собою образование *глицеральдегид-3-фосфата* и *седогептулозо-7-фосфата* из двух пентоз.

Таблица 15.1. **Пентозофосфатный путь**

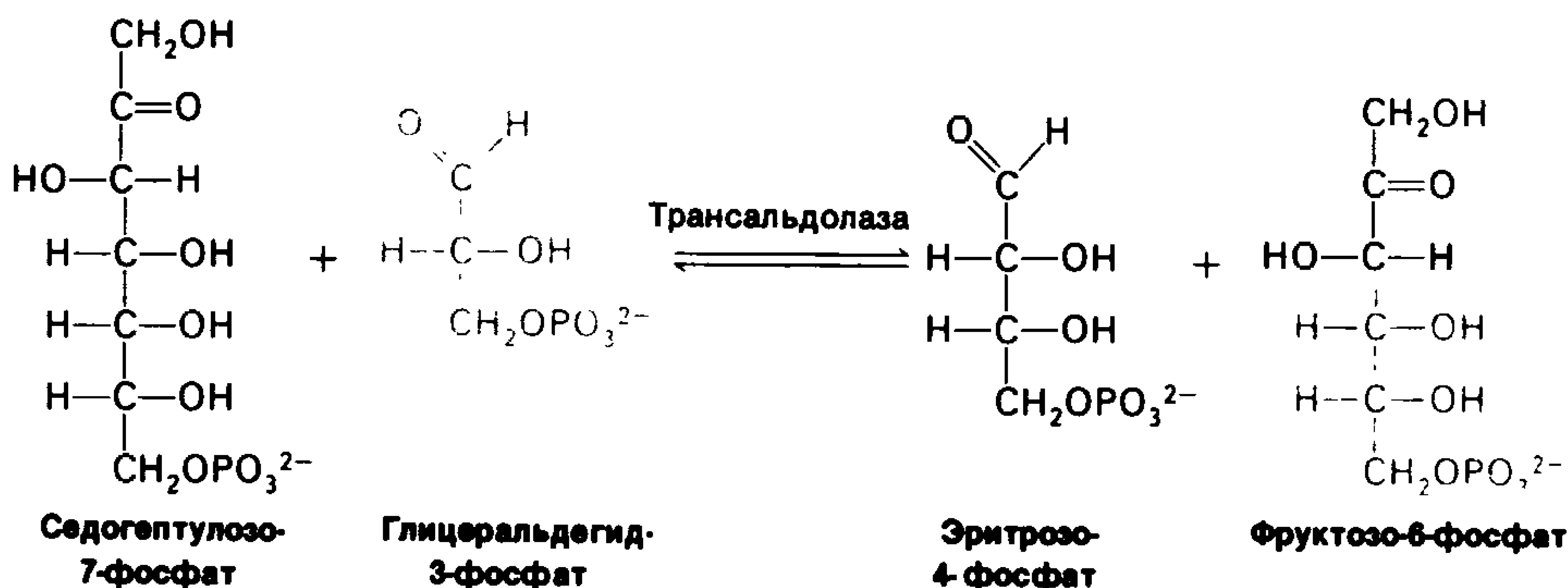
Реакция	Фермент
ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ВЕТВЬ	
Глюкозо-6-фосфат + $NADP^+ \rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons$ 6-фосфоглюконо-δ-лактон + + NADPH + H^+	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
6-фосфоглюконо-δ-лактон + + $H_2O \rightarrow$ 6-фосфоглюконат + H^+	Лактоназа
6-фосфоглюконат + $NADP^+ \rightarrow$ Рибулозо-5-фосфат + CO_2 + NADPH	6-фосфоглюконат-дегидрогеназа
НЕОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ВЕТВЬ	
Рибулозо-5-фосфат $\rightleftharpoons$ Рибозо-5-фосфат	Пентозофосфатизомераза
Рибулозо-5-фосфат $\rightleftharpoons$ Ксилулозо-5-фосфат	Пентозофосфатэпимераза
Ксилулозо-5-фосфат + Рибозо-5-фосфат $\rightleftharpoons$ Седогептулозо-7-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат	Транскетолаза
Седогептулозо-7-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат $\rightleftharpoons$ Фруктозо-6-фосфат + Эритрозо-4-фосфат	Трансальдолаза
Ксилулозо-5-фосфат + Эритрозо-4-фосфат $\rightleftharpoons$ фруктозо-6-фосфат + + Глицеральдегид-3-фосфат	Транскетолаза



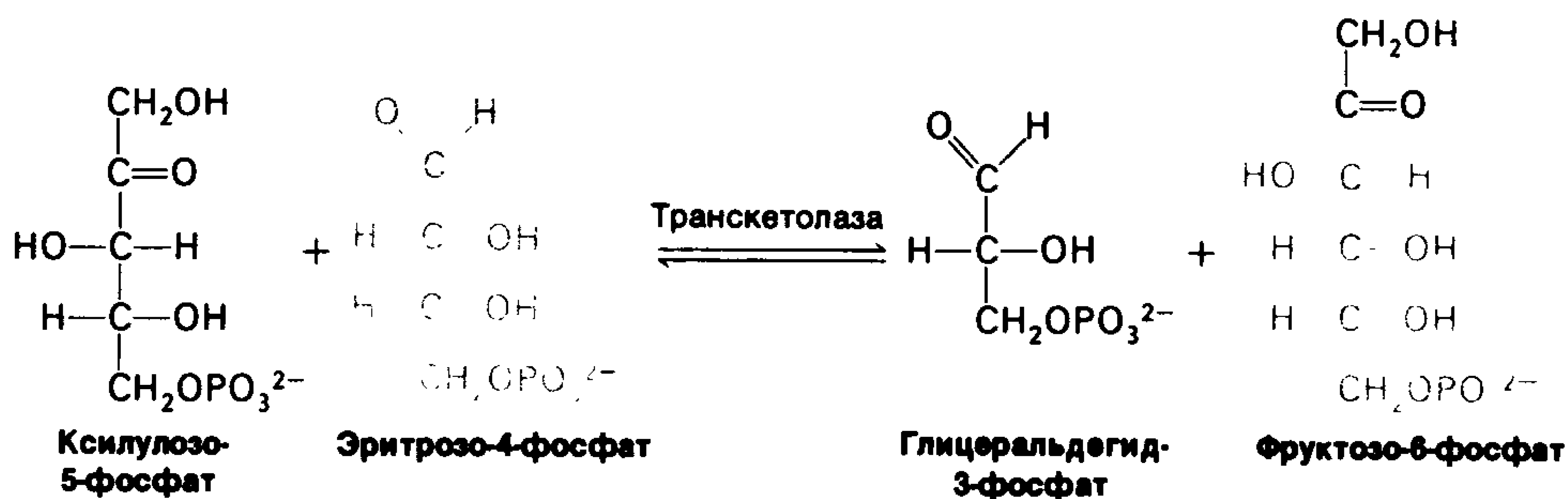


Роль донора двухуглеродного фрагмента в этой реакции выполняет ксилулозо-5-фосфат, эпимер рибулозо-5-фосфата. Кетоза может служить субстратом для транскетолазы только при условии, что ее гидроксильная группа при C-3 имеет конфигурацию ксилулозы, а не рибулозы. Рибулозо-5-фосфат под действием *пентозофосфатизомеразы* превращается в соответствующий эпимер, включающийся в транскетолазную реакцию.

Далее имеет место взаимодействие глицеральдегид-3-фосфата и седогептулозо-7-фосфата с образованием *фруктозо-6-фосфата и эритрозо-4-фосфата*. Этот синтез четырех- и шестиуглеродного сахаров катализируется *трансальдолазой*.



В третьей реакции транскетолаза катализирует синтез *фруктозо-6-фосфата* и *глицеральдегид-3-фосфата* из эритрозо-4-фосфата и ксилулозо-5-фосфата.



Суммируя эти реакции, получаем

2 Ксилулозо-5-фосфат + Рибозо-5-фосфат $\rightleftharpoons$ 2-фруктозо-6-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат.

Ксилулозо-5-фосфат может образоваться из рибозо-5-фосфата при последовательном действии пентозофосфат-изомеразы и пентозофосфат-эпимеразы. Таким образом, суммарная реакция, начиная с рибозо-5-фосфата, имеет следующий вид:

3 Рибозо-5-фосфат $\rightleftharpoons$ 2фруктозо-6-фосфат + + Глицеральдегид-3-фосфат.

Итак, избыток рибозо-5-фосфата, образованный в пентозофосфатном пути, может количественно превращаться в промежуточные продукты гликолиза.

15.5. Скорость функционирования пентозофосфатного пути регулируется концентрацией NADP$^+$

Первая реакция окислительной ветви пентозофосфатного пути, дегидрирование глюкозо-6-фосфата, по существу необратима. Действительно, при физиологических условиях эта реакция лимитирует скорость процесса и выполняет функцию «контрольного пункта». Наиболее важным регуляторным фактором является концентрация NADP$^+$, акцептора электронов при окислении глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Кроме того, NADPH конкурирует с NADP$^+$ за связывание с ферментом, и ATP конкурирует с глюкозо-6-фосфатом. Отношение концентрации NADP$^+$ к концентрации NADPH в цитозоле печени крыс, содержащихся на полноценном рационе, составляет примерно 0,014, что на несколько порядков ниже отношения [NAD$^+$]/[NADH], которое при этих же условиях равно 700. Выраженное действие концентрации NADP$^+$ на скорость превращений по окислительной ветви пентозофосфатного пути подтверждает, что генерирование NADPH тесно сопряжено с его использованием в восстановительных биосинтезах. Вопрос о регуляции неокислительной ветви пентозофосфатного пути до сих пор остается открытым.

15.6. Судьба глюкозо-6-фосфата зависит от потребности в NADPH, рибозо-5-фосфате и ATP

Проследим судьбу глюкозо-6-фосфата в четырех различных ситуациях.

1. *Потребность в рибозо-5-фосфате значительно превышает потребность в NADPH.* Бóльшая часть глюкозо-6-фосфата превращается во фруктозо-6-фостфат и глицеральдегид-3-фосфат по гликолитическому пути. Затем две молекулы фруктозо-6-фосфата и одна молекула глицеральдегид-3-фосфата превращаются под действием трансальдолазы и транскетолазы в три молекулы рибозо-5-фосфата путем обращения реакции, описанной ранее. Стехиометрия этого превращения (рис. 15.2, *А*) следующая:

5Глюкозо-6-фосфат + 5ATP →
→ 6Рибозо-5-фосфат + 5ADP + H^+.

2. *Потребность в NADPH и рибозо-5-фосфате сбалансирована.* При таких условиях преобладающей реакцией является образование двух молекул NADPH и одной молекулы рибозо-5-фосфата из одной молекулы глюкозо-6-фосфата по окислительной ветви пентозофосфатного пути. Стехиометрия этого превращения (рис. 15.2, *Б*) описывается уравнением

Глюкозо-6-фосфат + $2NADP^+$ + H_2O →
→ Рибозо-5-фосфат + 2NADPH +
+ $2H^+$ + CO_2.

3. *Потребность в NADPH значительно превышает потребность в рибозо-5-фосфате; глюкозо-6-фосфат полностью окисляется в CO_2.* В этой ситуации активно протекают три группы реакций. Во-первых, по окислительной ветви пентозофосфатно-

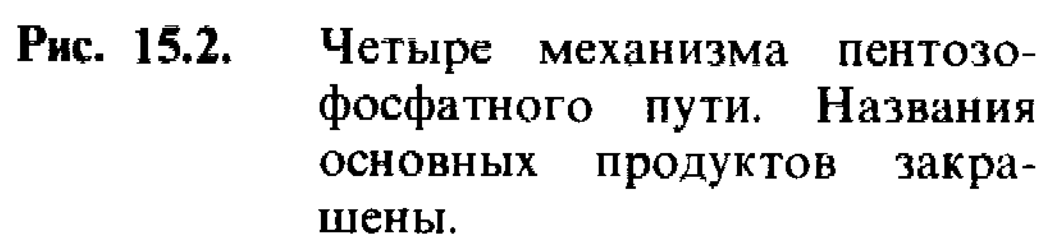
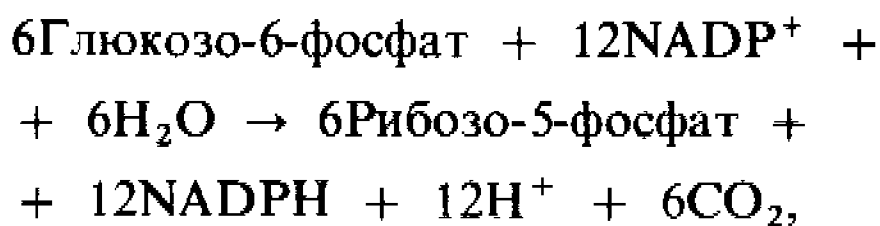
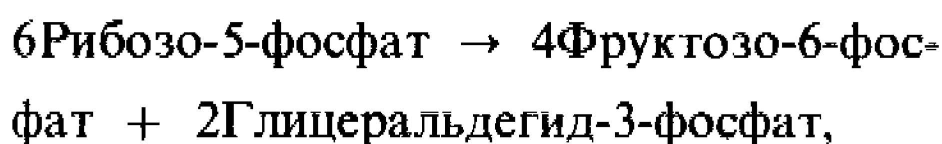


Рис. 15.2. Четыре механизма пентозофосфатного пути. Названия основных продуктов закрашены.

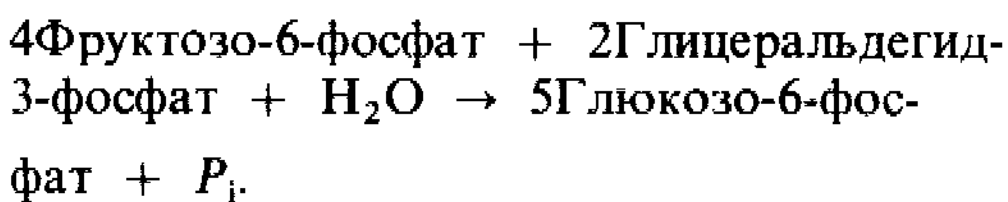
го пути образуются два NADPH и один рибозо-5-фосфат. Далее рибозо-5-фосфат превращается во фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат под действием транскетолазы и трансальдолазы. Наконец, происходит ресинтез глюкозо-6-фосфата из фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата по пути глюконеогенеза (рассматривается ниже в этой главе). Стехиометрия указанных реакций (рис. 15.2, *В*) описывается следующими уравнениями:



6Глюкозо-6-фосфат + $12NADP^+$ + $6H_2O$ → 6Рибозо-5-фосфат + $12NADPH$ + $12H^+$ + $6CO_2$,

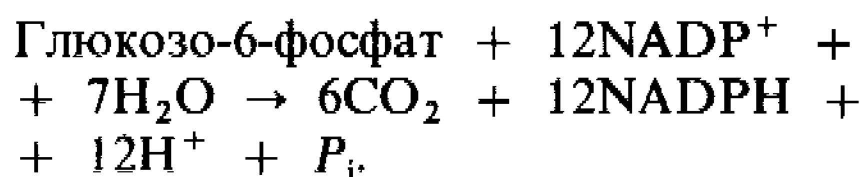


6Рибозо-5-фосфат → 4Фруктозо-6-фосфат + 2Глицеральдегид-3-фосфат,



4Фруктозо-6-фосфат + 2Глицеральдегид-3-фосфат + H_2O → 5Глюкозо-6-фосфат + P_i.

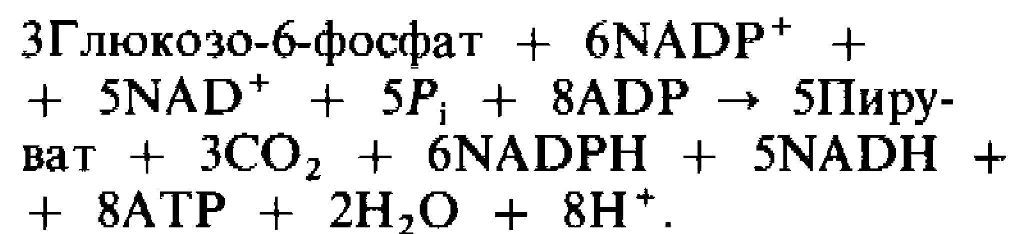
Суммируя эти реакции, получаем



Глюкозо-6-фосфат + $12NADP^+$ + $7H_2O$ → $6CO_2$ + $12NADPH$ + $12H^+$ + P_i.

Таким образом, эквивалент глюкозо-6-фосфата может быть полностью окислен до CO_2 с одновременным генерированием NADPH. Смысл указанных реакций состоит в том, что *рибозо-5-фосфат, образовавшийся по пентозофосфатному пути, вновь превращается в глюкозо-6-фосфат* под действием транскетолазы, трансальдолазы и некоторых ферментов глюконеогенеза.

4. *Потребность в NADPH значительно превышает потребность в рибозо-5-фосфате; глюкозо-6-фосфат превращается в пируват.* Возможен и другой путь: рибозо-5-фосфат образовавшийся по окислительной ветви пентозофосфатного пути, превращается в пируват (рис. 15.2, *Г*). Фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат, происходящие из рибозо-5-фосфата, вступают на гликолитический путь обмена, а не подвергаются обратному превращению в глюкозо-6-фосфат. Согласно изложенному механизму, происходит *одновременное генерирование ATP и NADPH и пять из шести атомов углерода глюкозо-6-фосфата появляются в пирувате:*



3Глюкозо-6-фосфат + $6NADP^+$ + $5NAD^+$ + $5P_i$ + $8ADP$ → 5Пируват + $3CO_2$ + $6NADPH$ + $5NADH$ + $8ATP$ + $2H_2O$ + $8H^+$.

Образовавшийся в этих реакциях пируват может окисляться с образованием дополнительного количества ATP или может быть использован в качестве строительного блока в различных биосинтетических процессах.

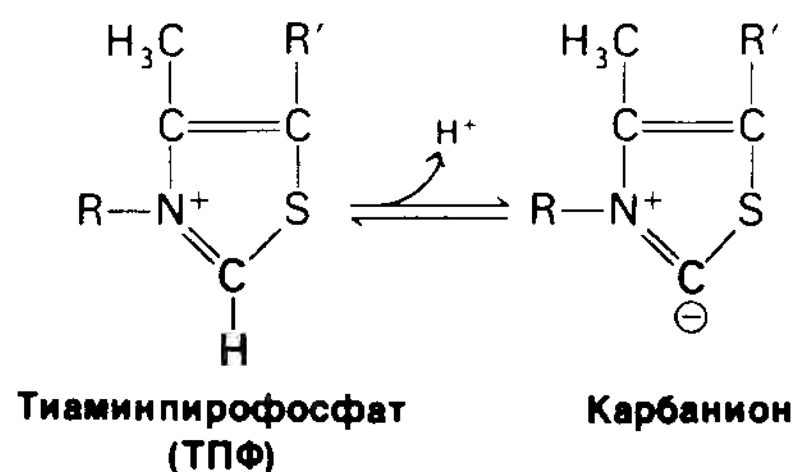
15.7. Активность пентозофосфатного пути в жировой ткани значительно выше, чем в мышцах

Опыты с радиоактивной меткой дают возможность измерить, сколько глюкозо-6-фосфата метаболизируется по пентозофосфатному пути и сколько по гликолитическому пути в сочетании с циклом трикарбоновых кислот. Для этого одну пробу тканевого гомогената инкубируют с глюкозой, меченной ^{14}C при С-1, другую – с глюкозой, меченной ^{14}C при С-6, и сравнивают радиоактивность CO_2, образовавшегося в обеих пробах. Смысл эксперимента состоит в том, что по пентозофосфатному пути происходит декарбоксилирование только при С-1, тогда как в ходе превращений глюкозы под действием пируват-дегидрогеназного комплекса по гликолитическому пути и далее в цикле трикарбоновых кислот декарбоксилирование при С-1 и при С-6 идет с одинаковой интенсивностью. Одинаковая степень декарбоксилирования при С-1 и С-6 в этой последней группе реакций объясняется быстрым взаимопревращением глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата под действием триозофосфат-изомеразы.

При таком экспериментальном подходе оказалось, что *активность пентозофосфатного пути находится на чрезвычайно низком уровне в скелетной мышце, но на очень высоком в жировой ткани.* Эти данные подтверждают предположение, что главная роль пентозофосфатного пути состоит в генерировании NADPH для восстановительных биосинтезов. Жировая ткань потребляет большие количества NADPH для восстановительного синтеза жирных кислот из ацетил-CoA (гл. 17).

15.8. Тиаминпирофосфат, простетическая группа транскетолазы, переносит активированные альдегиды

Транскетолаза содержит в качестве простетической группы прочно связанный тиаминпирофосфат (ТПФ). Мы уже встречались ранее с этой простетической группой, когда рассматривали декарбоксилирование пирувата пируват-дегидрогеназным комплексом. Механизм каталитического действия транскетолазы сходен с механизмом указанной выше реакции и состоит *в переносе активированного альдегидного фрагмента на акцептор.* В транскетолазной реакции акцептором служит альдоза, тогда как в случае пируват-дегидрогеназной реакции – липоамид. При обеих реакциях местом присоединения кетосубстрата является *тиазольное кольцо* простетической группы.



Углеродный атом С-2 имеет сильнокислотный характер и легко ионизируется с образованием *карбаниона,* который и присоединяется к карбонильной группе кетосубстрата (ксилулозо-5-фосфата, фруктозо-6-фосфата, седогептулозо-7-фосфата). Образующееся в результате промежуточное соединение теряет группу R—CHOH,

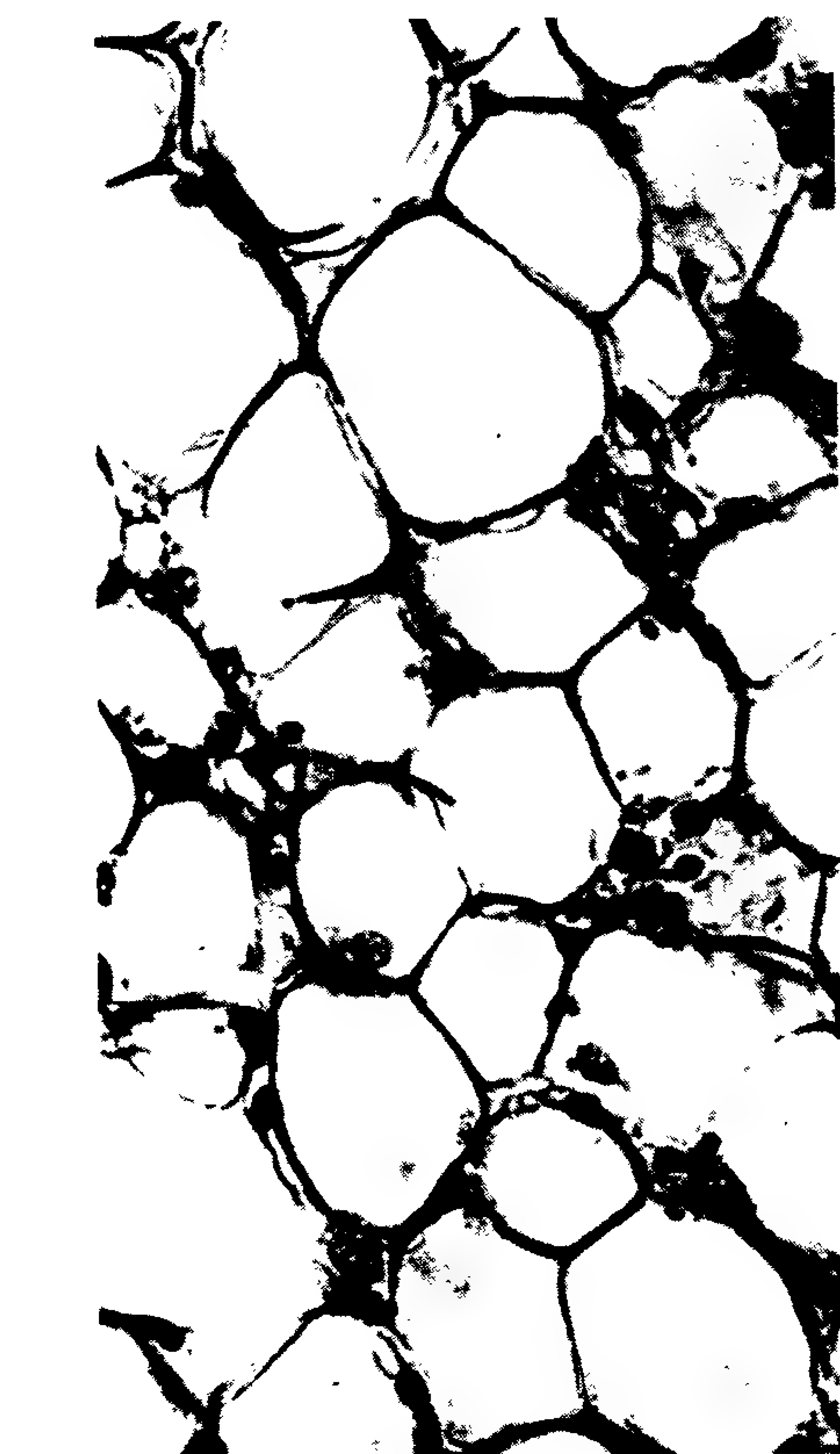
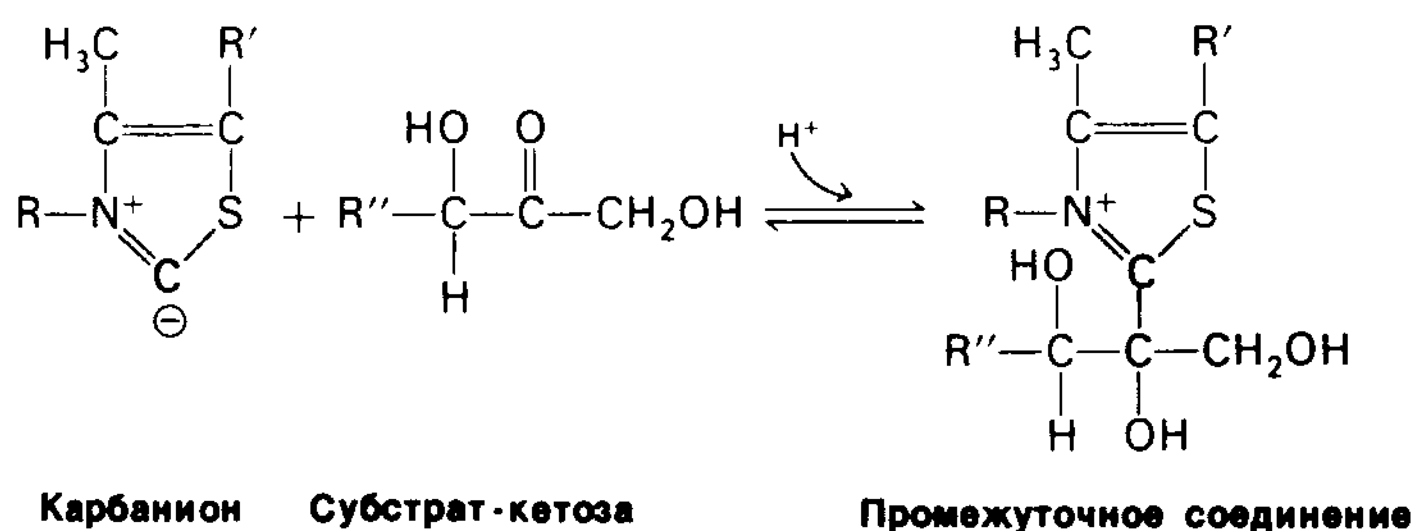
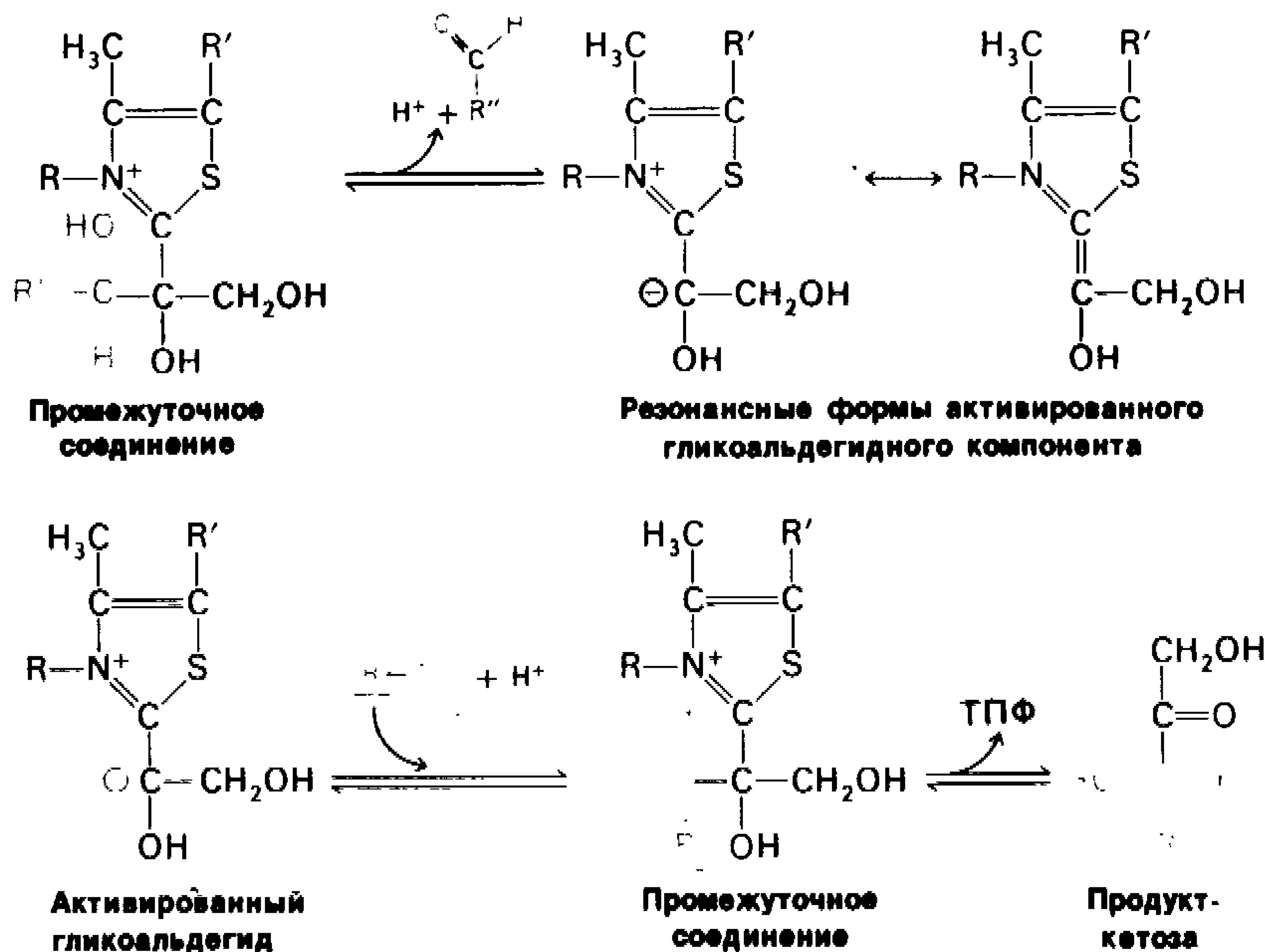


Рис. 15.3. Микрофотография жировой ткани.



образуя отрицательно заряженный *активированный гликоальдегидный компонент.* Положительно заряженный азот тиазольного кольца действует как улавливатель электронов, способствуя появлению отрицательного заряда на активированном промежуточном соединении.

Далее происходит конденсация карбонильной группы соответствующего альдегидного акцептора с активированным гликоальдегидным компонентом, приводящая к образованию новой кетозы, которая отделяется от фермента.

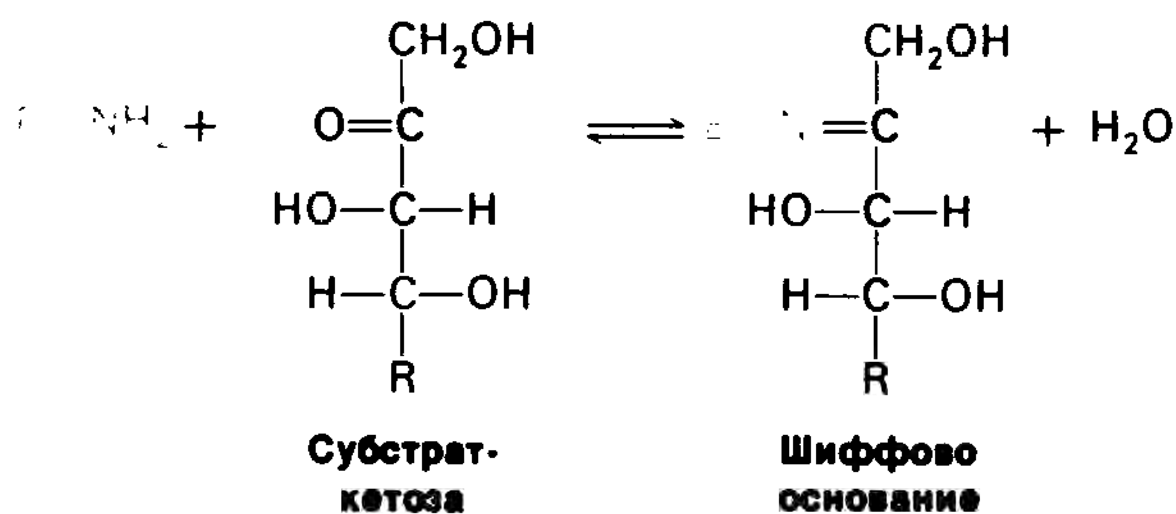


15.9. Нарушение способности транскетолазы связывать ТПФ может быть причиной нервно-психического расстройства

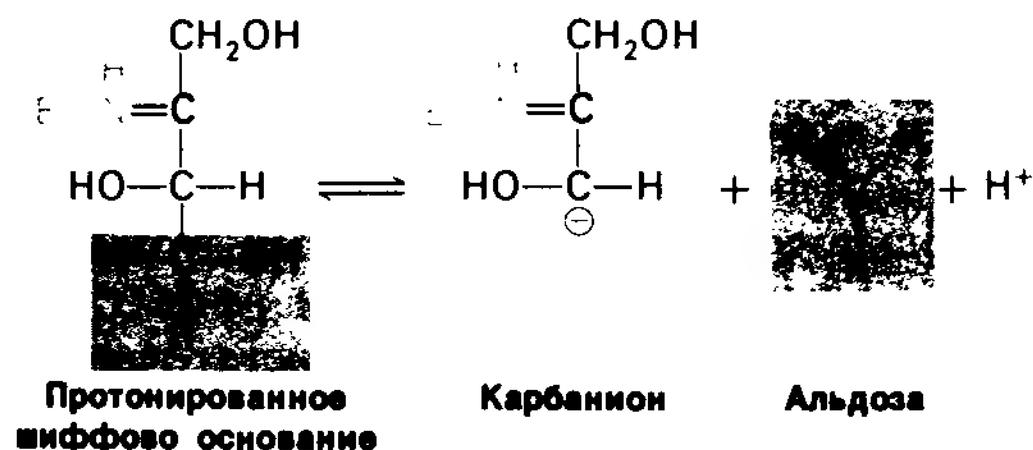
Недостаток тиамина в рационе чувствительных к нему людей может вызвать резко нервно-психическое расстройство – *синдром Вернике – Корсакова* (Wernicke–Korsakoff). Это заболевание характеризуется парезом глазодвигательного нерва, ненормальной осанкой и походкой и значительным нарушением психики. Особенно заметны дезориентация и сильное ослабление памяти. Известно, что данный синдром развивается только у очень небольшого числа алкоголиков и других лиц с длительно нарушенным питанием. При дефиците тиамина в диете это заболевание значительно чаще встречается у европейцев, чем у неевропейцев. Описанные наблюдения дают основание думать, что в предопределении развития синдрома Вернике - Корсакова при недостатке тиамина важную роль играют генетические факторы. Проведенные относительно недавно исследования транскетолазы культивируемых фибробластов показали, что это действительно так. *Способность связывать тиаминпирофосфат у транскетолазы от больных с синдромом Вернике – Корсакова в 10 раз ниже, чем у фермента здоровых людей.* Другие два тиамин-зависимых фермента, пируват-дегидрогеназа и α-оксоглутарат-дегидрогеназа, при этом заболевании не отличаются от нормы. Нарушения активности транскетолазы клинически проявляются лишь в том случае, когда содержание тиаминпирофосфата оказывается слишком низким для насыщения фермента. Это хороший пример взаимодействия между генетическими факторами и факторами окружающей среды в возникновении заболевания. Кроме того, синдром Вернике – Корсакова наглядно показывает, как снижение активности одного фермента может привести к серьезным неврологическим и поведенческим последствиям.

15.10. Активированный дигидроксиацетон переносится трансальдолазой в виде шиффова основания

Трансальдолаза переносит содержащий три атома углерода *дигидроксиацетон* от кетозы-донора к альдозе-акцептору. Этот фермент в отличие от транскетолазы не содержит простетической группы. *При взаимодействии между карбонильной группой кетозы-субстрата и ε-аминогруппой лизина активного центра трансальдолазы образуется шиффово основание.* Этот вид ковалентного фермент-субстратного (ES) промежуточного продукта подобен тому, который образуется при фруктозобисфосфат-альдолазной реакции на гликолитическом пути.



Шиффово основание становится протонированным, связь между С-3 и С-4 расщепляется, и происходит высвобождение альдозы.



Отрицательный заряд на дигидроксиацетоне стабилизируется путем резонанса. Положительно заряженный атом азота шиффова основания действует как улавливатель электронов. Атом азота играет такую же роль в трансальдолазе, как азот тиазольного кольца в транскетолазе.

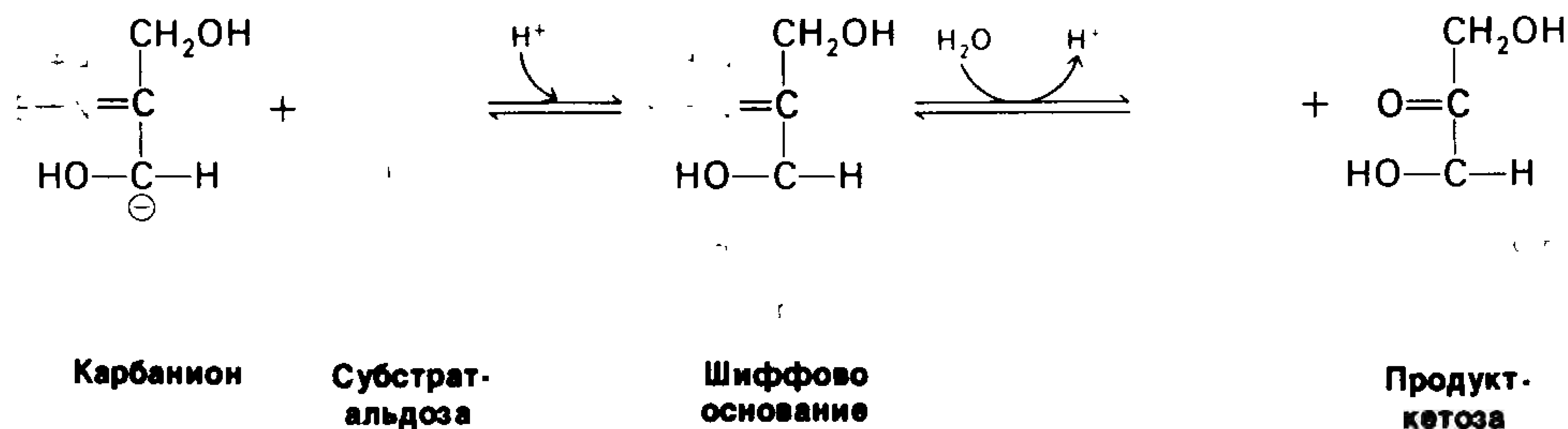


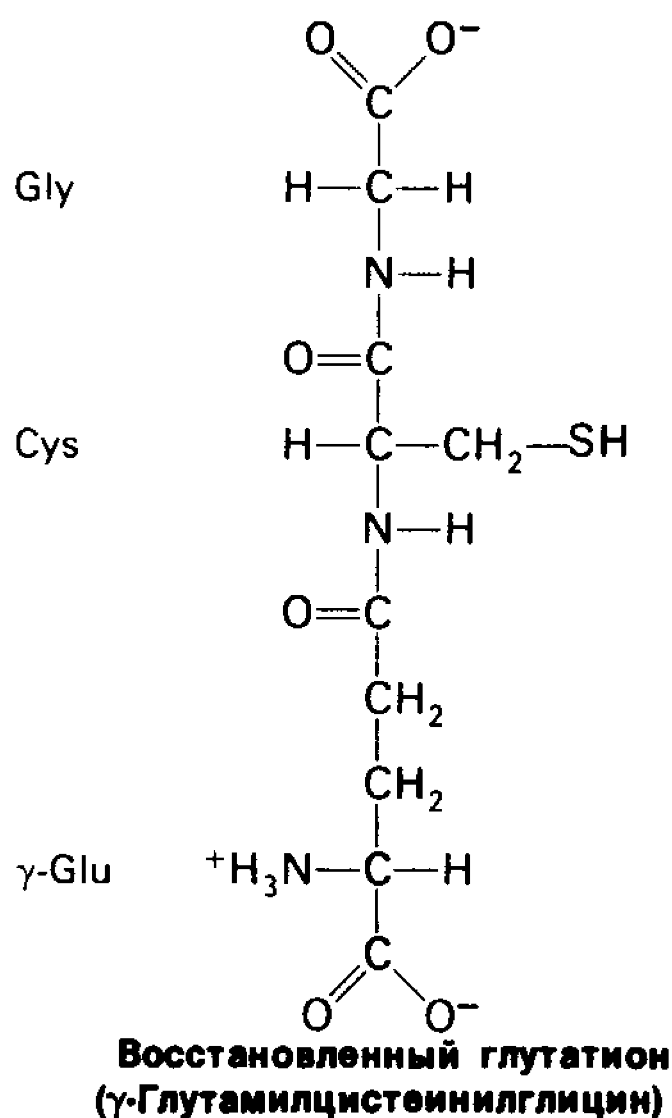
Шиффово основание между дигидроксиацетоном и трансальдолазой является стабильным до тех пор, пока не произойдет связывания соответствующей альдозы. Карбанион дигидроксиацетонового компонента реагирует тогда с карбонильной группой альдозы. Происходит гидролиз шиффова основания и освобождение кетозы в качестве продукта.

15.11. Недостаточность глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы – причина лекарственной гемолитической анемии

Начало применения противомалярийного препарата памахина (pamaquine) относится к 1926 г. Большинство больных переносило этот препарат хорошо, но у незначительной части больных в течение нескольких дней после начала лечения развивались острые патологические симптомы. Моча становилась черной, развивалась желтуха, резко падало содержание гемоглобина в крови. В некоторых случаях происходило обширное разрушение эритроцитов, вызывавшее смерть больных.

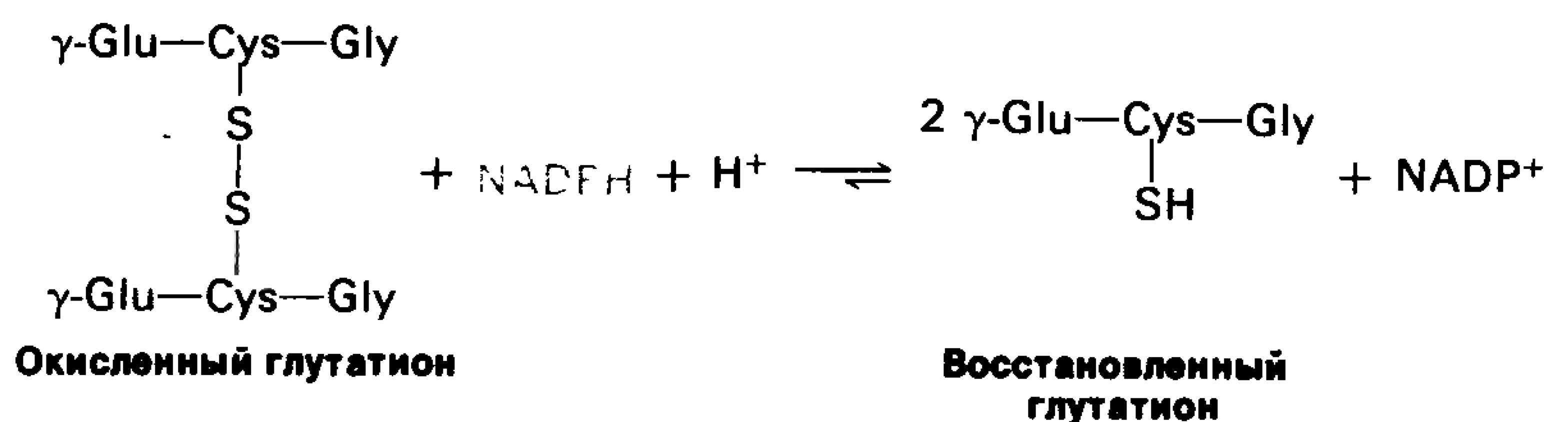
Причина этой *лекарственной гемолитической анемии* была раскрыта в 1956 г. Первичное нарушение – недостаточность глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы в эритроцитах. Пентозофосфатный путь – единственный источник NADPH в этих клетках, поэтому при недостаточности глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы образование NADPH уменьшается. Главная роль NADPH в эритроцитах состоит в восстановлении дисульфидной формы *глутатиона* в сульфгидрильную форму. Эта реакция катализируется *глутатионредуктазой*.





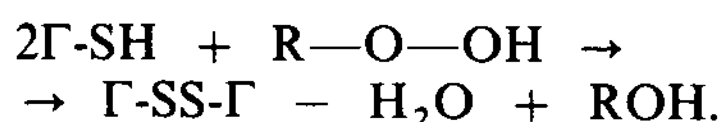
Восстановленный глутатион (γ-Глутамилцистеинилглицин)

Восстановленная форма глутатиона, трипептид со свободной сульфгидрильной группой, служит в качестве *сульфгидрильного буфера*, поддерживающего в восстановленном состоянии цистеиновые остатки гемоглобина и других белков эритроцитов.



Окисленный глутатион **Восстановленный глутатион**

Соотношение восстановленной (Г-SH) и окисленной (Г-SS-Г) форм глутатиона составляет в норме около 500. Восстановленная форма глутатиона играет также определенную роль в процессах детоксикации, реагируя с перекисью водорода и органическими перекисями:



$$2\text{Г-SH} + \text{R—O—OH} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Г-SS-Г} - H_2O + \text{ROH}.$$

Восстановленный глутатион имеет также важное значение для поддержания нормальной структуры эритроцитов и для сохранения гемоглобина в ферроформе. Клетки со сниженным содержанием восстановленного глутатиона обладают повышенной чувствительностью к гемолизу, причина которой пока не выяснена. Возможно, что в отсутствие восстановленного глутатиона лекарственные препараты, подобные памахину, вызывают изменения поверхности эритроцитов, что увеличивает их подверженность деструкции и удалению селезенкой. Эти препараты повышают также скорость образования токсических перекисей, которые в норме элиминируются путем реакции с восстановленным глутатионом.

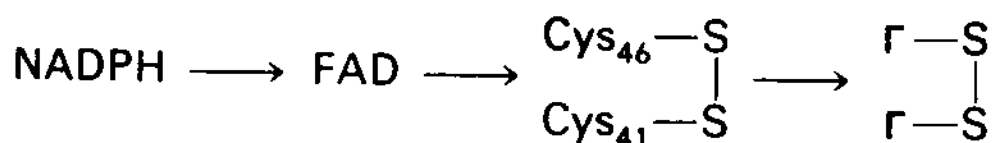
Недостаточность глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы-довольно распространенное заболевание. Оно наследуется как признак, связанный с полом. У гетерозиготных самок имеются две популяции эритроцитов: одна характеризуется нормальной ферментативной активностью, другая-недостаточностью глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы. В большинстве остальных тканей этот фермент детерминируется другим геном. Наиболее обычная форма недостаточности глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (тип А), при которой происходит десятикратное снижение активности фермента в эритроцитах, встречается у 11% американцев негритянского происхождения. Такая высокая частота говорит о том, что при определенных условиях окружающей среды эта недостаточность может создавать какие-то преимущества. Действительно, *недостаточность глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы в эритроцитах обусловливает, по-видимому, устойчивость к тропической малярии*, потому что для оптимального роста возбудителя (*Plasmodium falciparum*) болезни требуются нормально функционирующий пентозофосфатный путь и восстановленный глутатион. Таким образом, недостаток глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы и признак серповидноклеточности представляют собою параллельные механизмы защиты от малярии, что и обусловливает высокую частоту соответствующего гена в тех регионах мира, где распространена малярия.

Наличие недостаточности глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы отчетливо указывает на то, что *атипичные ответы на лекарственные средства могут иметь генетическую основу*. Такая наследуемая недостаточ-

ность фермента может быть относительно безвредной, до тех пор пока не вводятся определенные лекарства. Мы вновь встречаемся здесь с взаимодействием наследственности и окружающей среды при возникновении заболевания. Яркой иллюстрацией такого взаимодействия служат также галактоземия, наследственное отсутствие толерантности к фруктозе, фенилкетонурия и чувствительность к сукцинилхолину.

15.12. Глутатион-редуктаза переносит электроны от NADPH к окисленному глутатиону при участии FAD

Регенерирование восстановленного глутатиона катализируется глутатион-редуктазой, димером, субъединицы которого имеют мол. массу 50 кДа. Электроны от NADPH не переносятся прямо на дисульфидную связь окисленного глутатиона. Они переносятся от NADPH на прочно связанный флавинадениндинуклеотид (FAD), затем на дисульфидный мостик между двумя остатками цистеина в субъединице и, наконец, на окисленный глутатион.



Каждая субъединица состоит из трех структурных доменов: FAD-связывающего домена, NADPH-связывающего домена и пограничного домена (рис. 15.4). Домены, связывающие FAD и $NADP^+$, сходны друг с другом и подобны нуклеотидсвязывающим доменам в других дегидрогеназах. FAD и $NADP^+$ связываются в вытянутой форме, их изоаллоксазиновое и никотинамидное кольца оказываются при этом по соседству друг с другом (рис. 15.4). Интересно отметить, что место связывания окисленного глутатиона образуется FAD-связывающим доменом одной субъединицы и пограничным доменом другой субъединицы.

15.13. Глюкоза может синтезироваться из неуглеводных предшественников

Мы перейдем теперь к *синтезу глюкозы из неуглеводных предшественников*, процессу, называемому *глюконеогенезом*. Этот метаболический путь имеет очень важное значение, поскольку некоторые ткани, и в частности мозг, в высшей степени зависят от глюкозы как первичного топлива. Дневная потребность мозга взрослого человека

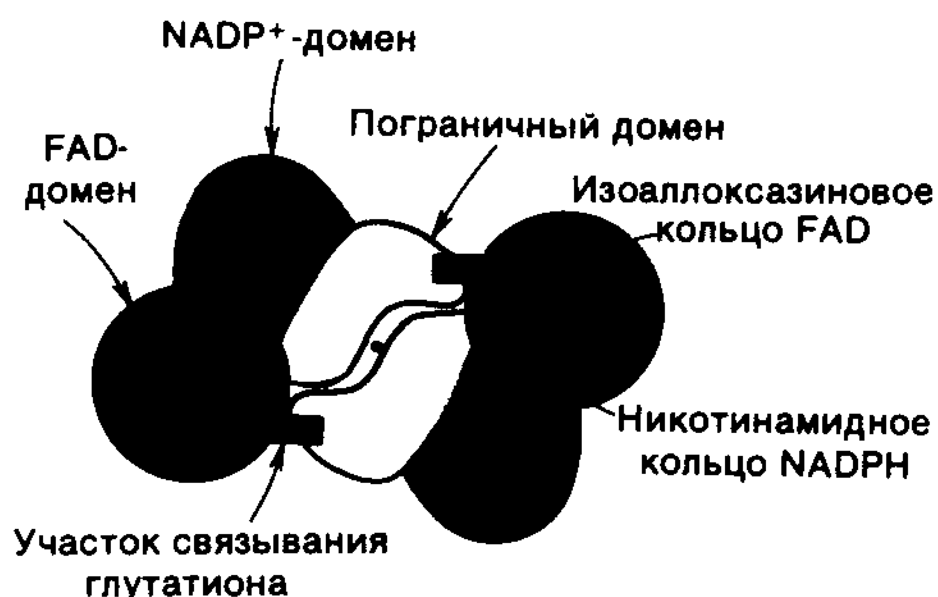


Рис. 15.4. Схематическое изображение доменной структуры глутатион-редуктазы. Каждая субъединица этого димерного фермента состоит из $NADP^+$-домена, FAD-домена и пограничного домена. Глутатион связан с FAD-доменом одной субъединицы и пограничным доменом другой субъединицы [Schultz G. E., Schirmer R. H., Sachsenheimer W., Pai E. F., Nature, **237**, 123 (1978).]

в глюкозе составляет примерно 120 г, т. е. на долю мозга приходится бóльшая часть общей потребности организма в глюкозе (160 г). В жидкостях тела присутствует около 20 г глюкозы, и примерно 190 г глюкозы может быть легко получено из гликогена, ее резервной формы (гл. 16). Таким образом, «прямых» резервов глюкозы вполне достаточно для удовлетворения потребности в ней в течение одного дня. При более длительном голодании для обеспечения жизнеспособности организма глюкоза должна образовываться из неуглеводных источников. Важную роль играет глюконеогенез также в периоды интенсивной физической нагрузки.

Основными неуглеводными предшественниками глюкозы служат *лактат, аминокислоты и глицерол*. Лактат образуется в работающей скелетной мышце, когда скорость гликолиза превосходит скорость превращений в цикле трикарбоновых кислот и в дыхательной цепи (разд. 12.10). Аминокислоты происходят из белков, поступающих с пищей, а при голодании образуются в результате распада белков скелетных мышц

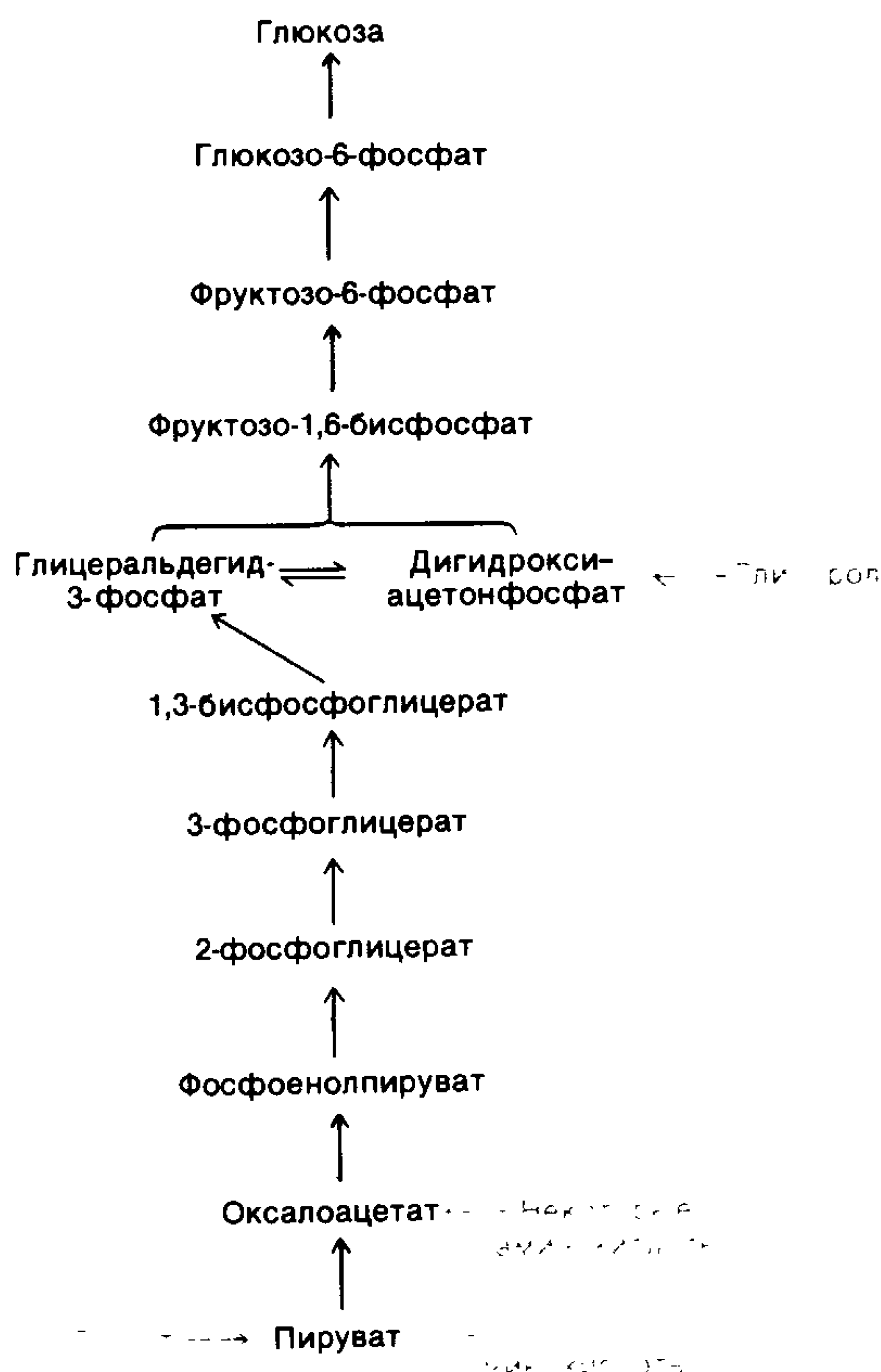


Рис. 15.5. Путь глюконеогенеза. Отличительные реакции этого пути показаны красными стрелками. Остальные реакции – общие с реакциями гликолиза. Ферменты глюконеогенеза локализованы в цитозоле, кроме пируват-карбоксилазы (в митохондриях) и глюкозо-6-фосфатазы (связана с эндоплазматическим ретикулумом). Указаны этапы («пункты входа»), на которых в глюконеогенез включаются лактат, глицерол и аминокислоты.

(разд. 23.8). В результате гидролиза триацилглицеролов (разд. 17.4) в жировых клетках образуются глицерол и жирные кислоты. Глицерол служит предшественником глюкозы, тогда как жирные кислоты не могут превращаться в организме животных в глюкозу по причинам, которые будут обсуждаться позднее (разд. 17.14). *По пути глюконеогенеза происходит превращение пирувата в глюкозу.* Включение метаболитов в этот путь происходит в основном на уровне пирувата, оксалоацетата и дигидроксиацетонфосфата (рис. 15.5).

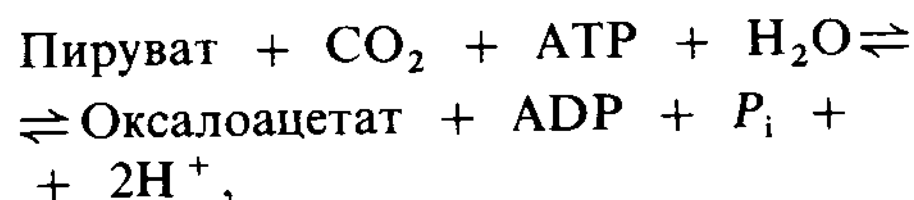
Главным местом глюконеогенеза служит *печень.* Этот процесс протекает также в коре *почек*, но общее количество глюкозы, образующейся в почках, составляет лишь 1/10 такового и печени, что объясняется меньшей массой почечной ткани. Очень незначительный глюконеогенез имеет место в мозгу, а также в скелетной и сердечной мышцах. Скорее всего *глюконеогенез в печени и почках обеспечивает такое содержание глюкозы в крови, при котором мозг и мышцы могут извлекать из крови достаточные количества глюкозы для удовлетворения своих метаболических потребностей.*

15.14. Глюконеогенез – это не обращение гликолиза

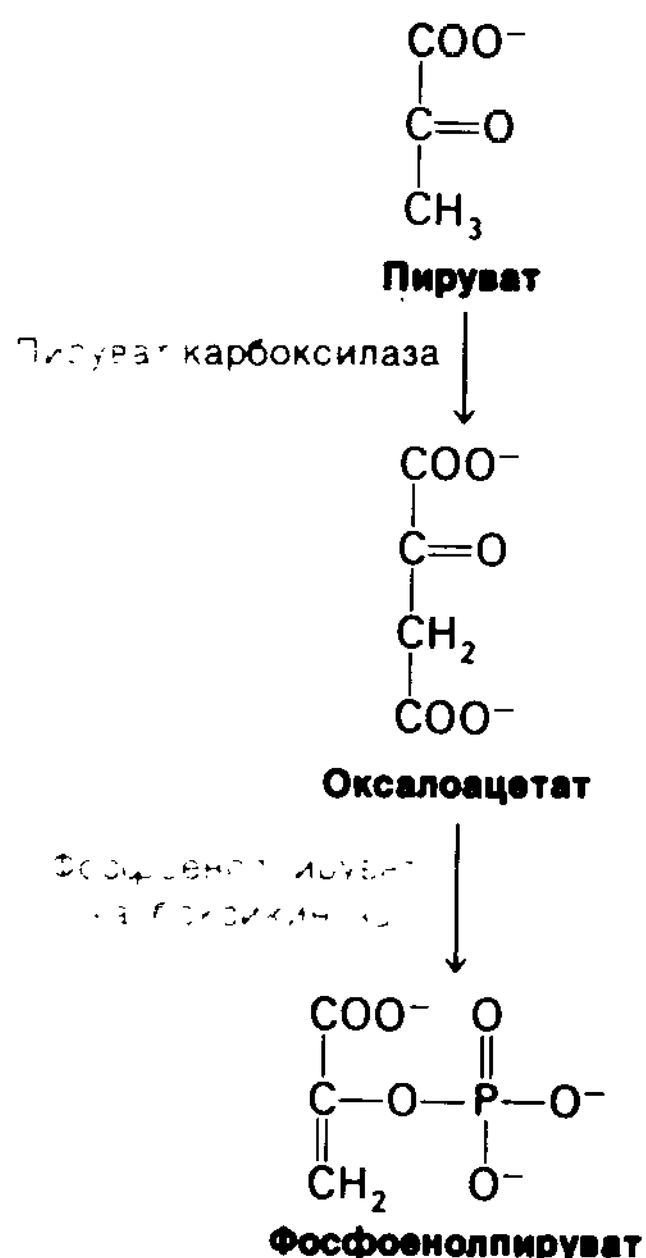
При гликолизе глюкоза превращается в пируват, при глюконеогенезе пируват превращается в глюкозу. Однако глюконеогенез – это отнюдь не обращение гликолиза. Он должен идти по иному пути, поскольку термодинамическое равновесие гликолиза сдвинуто далеко в сторону образования пирувата. В обычных условиях, существующих в клетках, фактическое значение ΔG для образования пирувата из глюкозы составляет около -20 ккал/моль (разд. 12.9). Уменьшение свободной энергии при гликолизе происходит в основном на трех необратимых стадиях, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой.

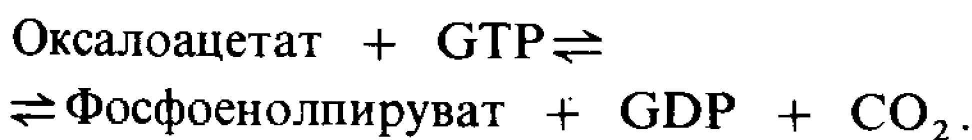
Путь глюконеогенеза обходит эти фактически необратимые реакции гликолиза при помощи следующих новых этапов:

1. *Фосфоенолпируват образуется из пирувата через оксалоацетат.* Вначале происходит карбоксилирование пирувата в оксалоацетат с потреблением одной молекулы ATP. Затем оксалоацетат подвергается декарбоксилированию и фосфорилированию с образованием фосфоенолпирувата за счет второй высокоэнергетической фосфатной связи.



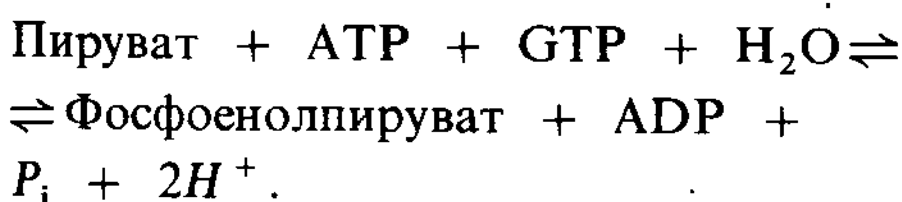
$$\text{Пируват} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \rightleftharpoons \text{Оксалоацетат} + \text{ADP} + P_i + + 2H^+,$$





$$\text{Оксалоацетат} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{Фосфоенолпируват} + \text{GDP} + CO_2.$$

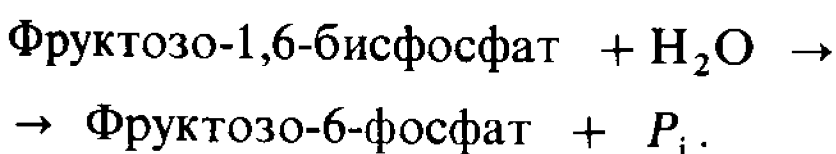
Первая реакция катализируется *пируват-карбоксилазой*, вторая – *фосфоенолпируват-карбоксикиназой*. Суммируя эти реакции, получаем



$$\text{Пируват} + \text{ATP} + \text{GTP} + H_2O \rightleftharpoons \text{Фосфоенолпируват} + \text{ADP} + P_i + 2H^+.$$

Данный путь образования фосфоенолпирувата из пирувата термодинамически выгоден, поскольку $\Delta G^{0\prime}$ равно $+0{,}2$ ккал/моль, в отличие от $+7{,}5$ ккал/моль для реакции, катализируемой пируваткиназой. Это значительно более благоприятное значение $\Delta G^{0\prime}$ обусловлено участием в процессе дополнительной высокоэнергетической фосфатной связи.

2. *Фруктозо-6-фосфат образуется из фруктозо-1,6-бисфосфата путем гидролиза фосфатного эфира при С-1.* Этот экзергонический гидролиз катализируется фруктозо-1,6-бисфосфатазой.

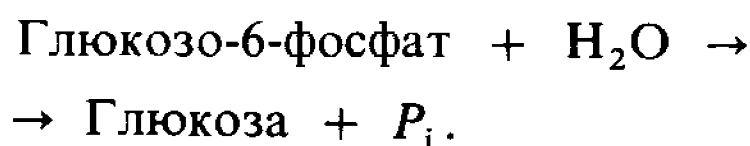


$$\text{Фруктозо-1,6-бисфосфат} + H_2O \rightarrow \text{Фруктозо-6-фосфат} + P_i.$$

3. *Глюкоза образуется путем гидролиза глюкозо-6-фосфата*, реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатазой.

Таблица 15.2. **Различия ферментов гликолиза и глюконеогенеза**

Гликолиз	Глюконеогенез
Гексокиназа	Глюкозо-6-фосфатаза
Фосфофруктокиназа	Фруктозо-1,6-бисфосфатаза
Пируваткиназа	Пируват-карбоксилаза
	Фосфоенолпируват-карбоксикиназа

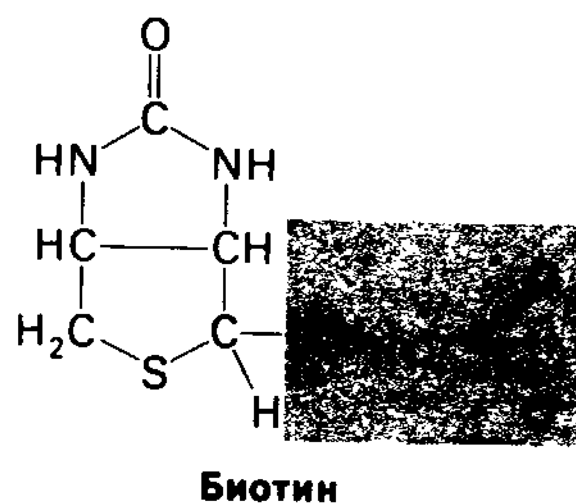


$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{Глюкоза} + P_i.$$

Глюкозо-6-фосфатаза связана с эндоплазматическим ретикулумом и действует на субстрат, локализованный в цитозоле. В мозгу и мышцах этого фермента нет, и поэтому глюкоза не выводится из этих органов.

15.15. Биотин – мобильный переносчик активированного CO_2

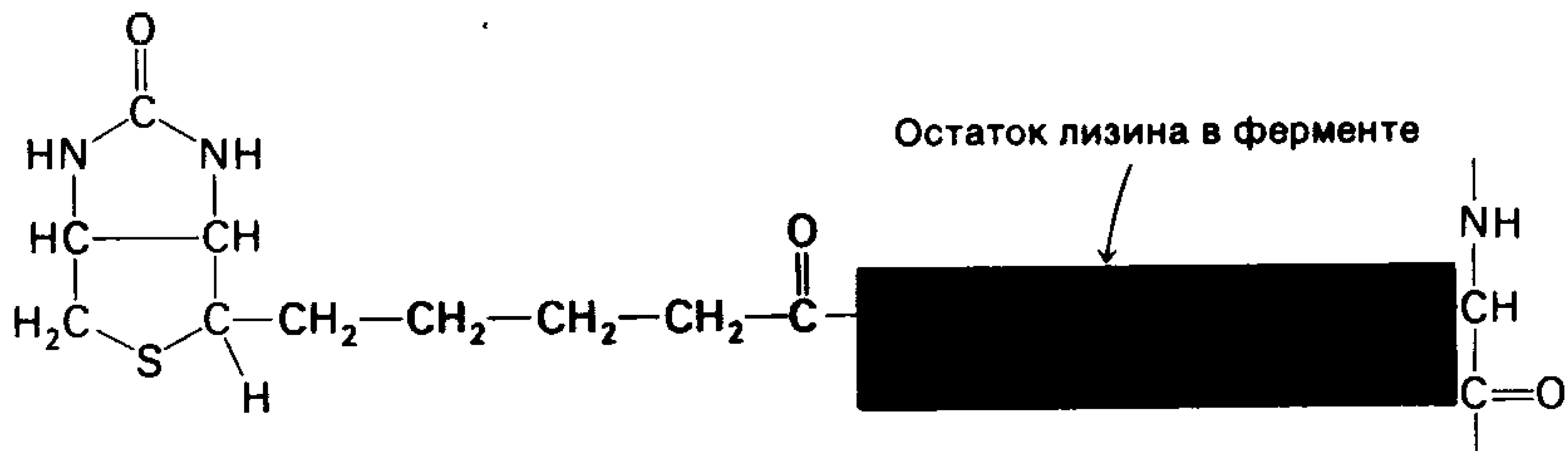
Обнаружение того факта, что в митохондриях происходит образование оксалоацетата из пирувата, привело Мертона Аттера (Merton Utter) к открытию в 1960 г. пируват-карбоксилазы. Этот фермент представляет особый интерес из-за его каталитических и аллостерических свойств. Пируват-карбоксилаза содержит ковалентно присоединенную простетическую группу, *биотин*, который функционирует в качестве *переносчика активированного CO_2*.



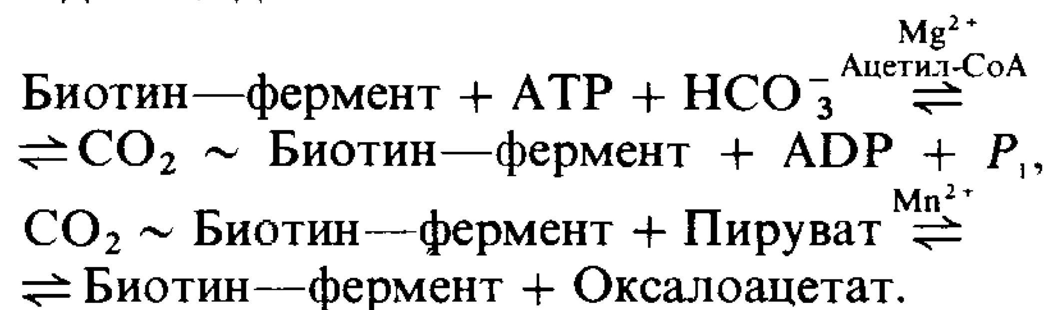
Биотин

Карбоксильный конец биотина связан амидной связью с ε-аминогруппой специфического остатка лизина.

Заметим, что биотин присоединен к пируват-карбоксилазе *длинной гибкой цепью*, сходной с цепью, связывающей липоамид в пируват-дегидрогеназном комплексе.



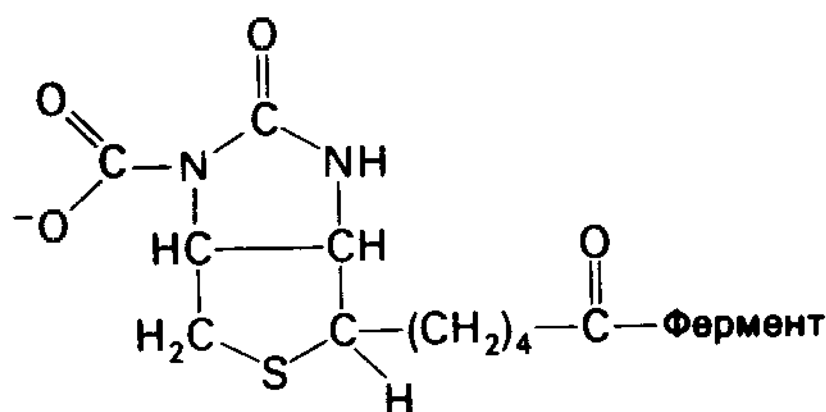
Карбоксилирование пирувата протекает в две стадии:



$$\text{Биотин—фермент} + \text{ATP} + HCO_3^- \underset{\text{Ацетил-CoA}}{\overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons}} CO_2 \sim \text{Биотин—фермент} + \text{ADP} + P_i,$$

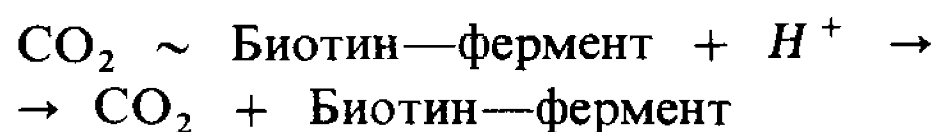
$$CO_2 \sim \text{Биотин—фермент} + \text{Пируват} \overset{Mn^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{Биотин—фермент} + \text{Оксалоацетат}.$$

Карбоксильная группа в промежуточном продукте карбоксибиотин—фермент связана с атомом N-1 биотинового кольца.



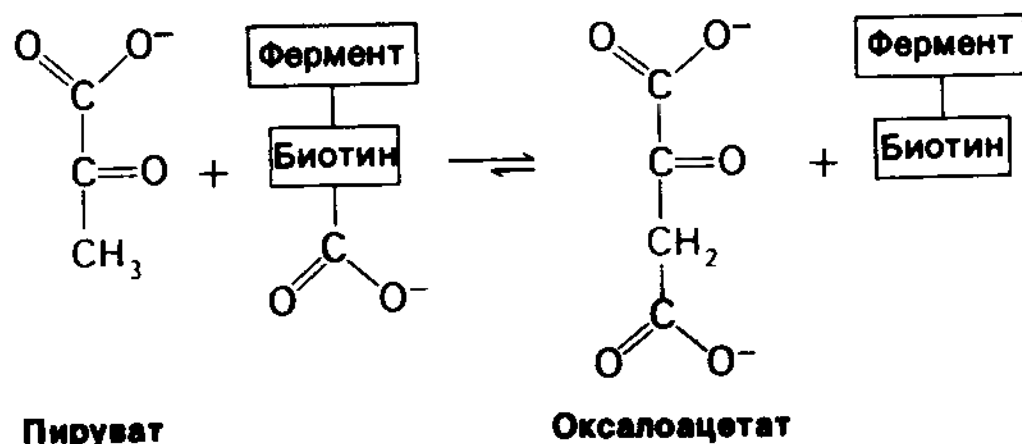
Карбоксибиотин — Фермент (промежуточный продукт)

В этом промежуточном продукте карбоксильная группа *активирована*. $\Delta G^{0'}$ для ее отщепления



$$CO_2 \sim \text{Биотин—фермент} + H^+ \rightarrow CO_2 + \text{Биотин—фермент}$$

составляет − 4,7 ккал/моль, что обусловливает способность карбоксибиотина к переносу CO_2 на акцепторы без дополнительного потребления свободной энергии.

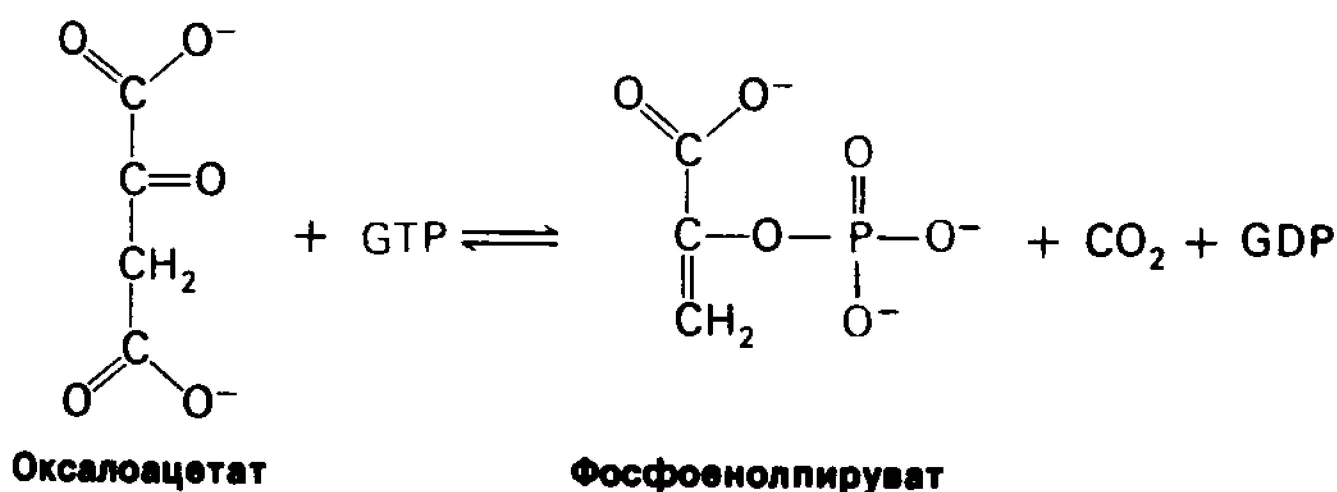


Активированная карбоксильная группа переносится затем с карбоксибиотина на пируват с образованием оксалоацетата. Длинная гибкая цепь между биотином и ферментом сообщает этой простетической группе способность поворачиваться от одного активного центра фермента (АТР-бикарбонатный участок) к другому (пируватному участку).

15.16. Пируват-карбоксилаза активируется при участии ацетил-СоА

Активность пируват-карбоксилазы зависит от присутствия ацетил-СоА. *В отсутствие связанного с ферментом ацетил-СоА (или другого близкого к нему ацил-СоА) биотин не карбоксилируется.* Вторая частичная реакция не зависит от ацетил-СоА. Аллостерическая активация пируват-карбоксилазы при участии ацетил-СоА представляет собой важный физиологический механизм контроля. Оксалоацетат, продукт пируват-карбоксилазной реакции, является одновременно и стехиометрическим промежуточным продуктом глюконеогенеза, и каталитическим промежуточным продуктом цикла трикарбоновых кислот. *Высокое содержание ацетил-СоА служит сигналом необходимости большего количества оксалоацетата.* Если имеет место избыток АТР, оксалоацетат потребляется в процессе глюконеогенеза. В условиях недостатка АТР оксалоацетат включается в цикл трикарбоновых кислот, конденсируясь с ацетил-СоА.

Таким образом, пируват-карбоксилаза не только имеет важное значение для глюконеогенеза, но играет также *критическую роль в поддержании необходимой концентрации промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот.* Указанные промежуточные продукты должны все время восполняться, поскольку они потребляются при некоторых биосинтетических реакциях, например при синтезе гема. Эта роль пируват-карбоксилазы получила название *анаплеротической*, что означает восполняющая, компенсирующая.



15.17. Оксалоацетат переходит по челночному механизму в цитозоль и превращается в фосфоенолпируват

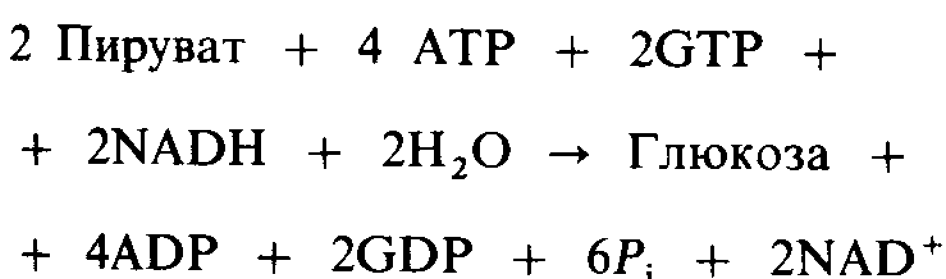
Пируват-карбоксилаза – митохондриальный фермент, тогда как другие ферменты глюконеогенеза находятся в цитоплазме. Оксалоацетат, продукт пируват-карбоксилазной реакции, переносится через митохондриальную мембрану в форме *малата*. Его восстановление в малат происходит в митохондриях под действием NADH-зависимой малат-дегидрогеназы. Образующийся при этом малат транспортируется переносчиком через митохондриальную мембрану и вновь окисляется в оксалоацетат NAD^+-зависимой малат-дегидрогеназой цитозоля.

Оксалоацетат подвергается в цитозоле одновременно *декарбоксилированию* и *фосфорилированию* под действием фосфоенолпируват-карбоксикиназы.

На этой стадии происходит отделение CO_2, присоединившегося к пирувату под действием прируват-карбоксилазы. Реакция фосфорилирования становится энергетически возможной благодаря одновременному декарбоксилированию. *Процессы декарбоксилирования часто приводят в движение реакции, которые в ином случае были бы высокоэндергоническими.* Мы вновь встретимся с этим механизмом в разделе, посвященном синтезу жирных кислот.

15.18. Шесть высокоэнергетических фосфатных связей расходуются при синтезе глюкозы из пирувата

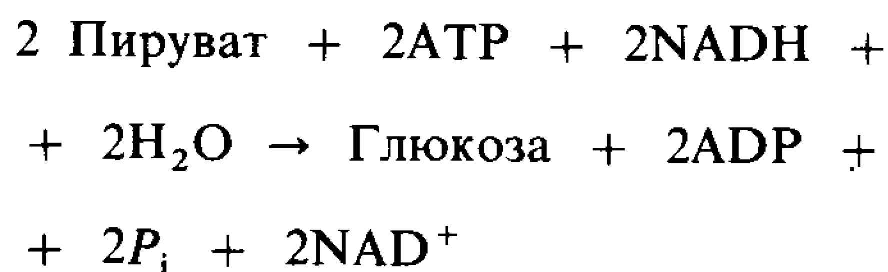
Стехиометрия глюконеогенеза описывается уравнением



$$2\ \text{Пируват} + 4\ ATP + 2GTP + 2NADH + 2H_2O \rightarrow \text{Глюкоза} + 4ADP + 2GDP + 6P_i + 2NAD^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = -9\ \text{ккал/моль}.$$

Стехиометрия обращения гликолиза носит иной характер:



$$2\ \text{Пируват} + 2ATP + 2NADH + 2H_2O \rightarrow \text{Глюкоза} + 2ADP + 2P_i + 2NAD^+$$

$$\Delta G^{0\prime} = +20\ \text{ккал/моль}.$$

Заметим, что для синтеза глюкозы из пирувата путем глюконеогенеза используется *шесть* высокоэнергетических фосфатных связей, тогда как в процессе пре-

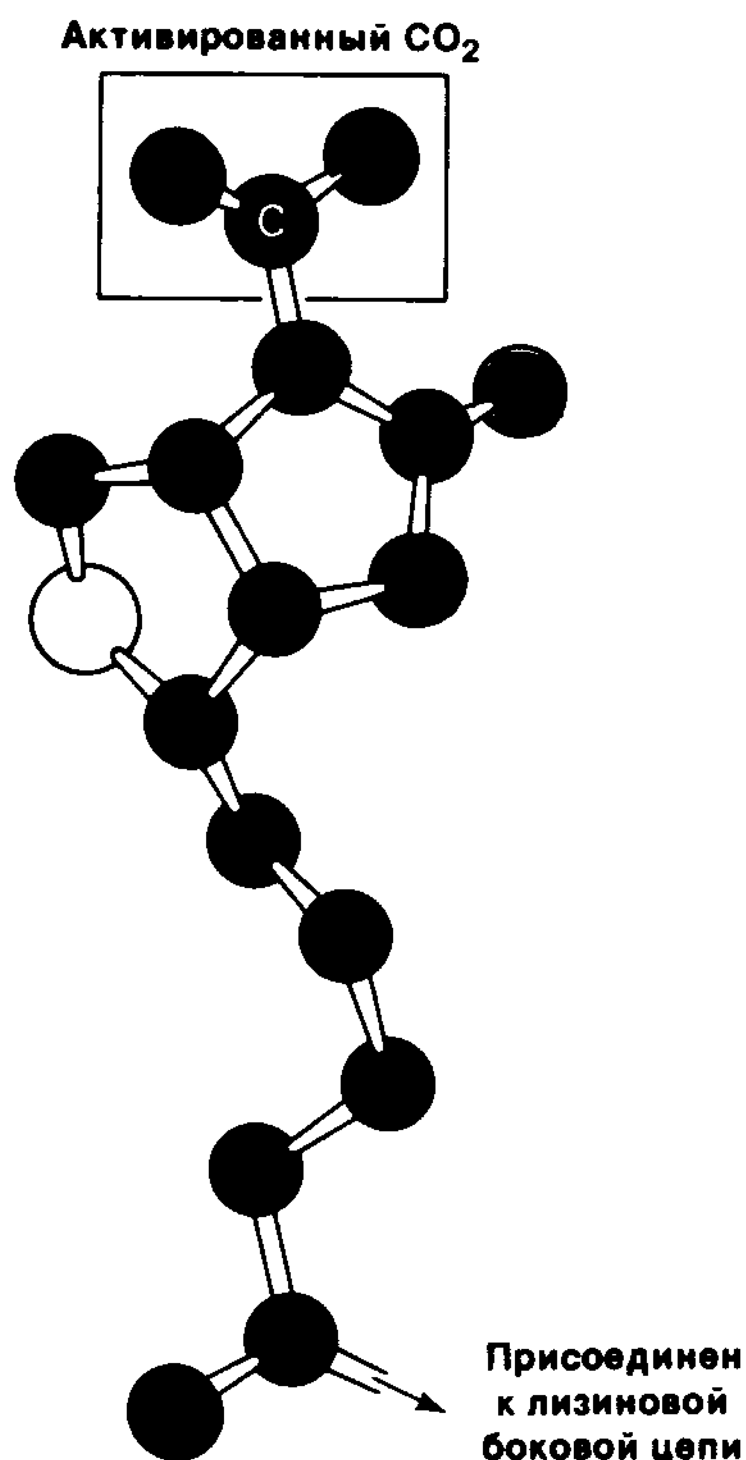


Рис. 15.6. Молекулярная модель карбоксибиотина.

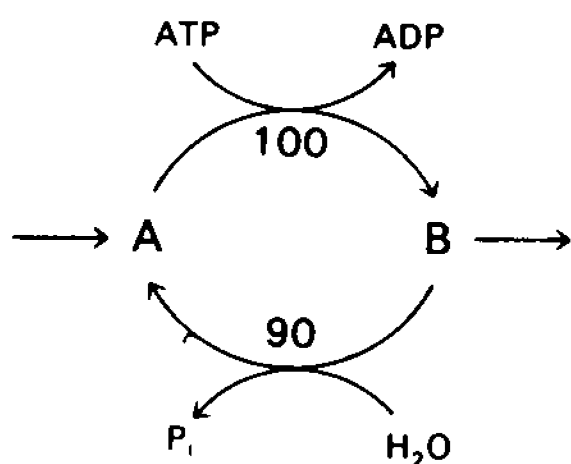
вращения глюкозы в пируват при гликолизе образуются только *две* молекулы ATP. Таким образом, избыточная «цена» глюконеогенеза равна четырем высокоэнергетическим фосфатным связям в расчете на одну молекулу глюкозы, синтезируемой из пирувата. Для превращения энергетически неблагоприятного процесса (обращение гликолиза, $\Delta G^{0\prime} = +20$ ккал/моль) в энергетически благопрятный (глюконеогенез, $\Delta G^{0\prime} = -9$ ккал/моль) требуются четыре лишние высокоэнергетические фосфатные связи. Рассматривая это энергетическое различие между гликолизом и глюконеогенезом под другим углом зрения, напомним, что вклад одного эквивалента ATP изменяет константу равновесия реакции примерно в 10^8 раз (разд. 11.7). Следовательно, вклад четырех дополнительных высокоэнергетических связей при глюконеогенезе изменяет эту константу в 10^{32} раз, что делает превращение пирувата в глюкозу термодинамически выгодным.

15.19. Глюконеогенез и гликолиз регулируются реципрокно

Глюконеогенез и гликолиз координируются таким образом, что когда активность одного из этих путей находится на относительно низком уровне, другой путь является высокоактивным. В случае одновременной высокой активности обеих последовательностей реакций происходил бы гидролиз четырех $\sim$P (два ATP + два GTP) на каждый цикл реакции. В условиях, существующих в клетке, и гликолиз, и глюконеогенез представляют собою высокоэкзергонические процессы, так что термодинамических барьеров для осуществления таких циклов нет. Тот факт, что активность этих двух процессов никогда не достигает высокого уровня одновременно, обусловливается скорее всего соответствующей регуляцией отдельных ферментов каждого процесса. Например, AMP стимулирует фосфофруктокиназу (разд. 12.9), но ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу. Цитрат оказывает на эти ферменты противоположное действие. *Следовательно, фосфорилирование фруктозо-6-фосфата, этап, лимитирующий скорость гликолиза, усиливается при низком энергетическом заряде клетки. Напротив, при высоком энергетическом заряде и избытке промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот происходит гидролиз фруктозо-1,6-бисфосфата и стимулируется глюконеогенез.* Пируваткиназа (разд. 12.7) и пируват-карбоксилаза (разд. 15.16) также регулируются реципрокно. Фруктозо-1,6-бисфосфат стимулирует, а ATP ингибирует пируваткиназу, тогда как пируват-карбоксилаза стимулируется ацетил-CoA и подавляется ADP. Таким образом, *обогащение клеток печени топливными молекулами и ATP благоприятствует превращению пирувата в фосфоенолпируват и глюконеогенезу.*

15.20. Субстратные циклы амплифицируют метаболические сигналы и образование тепла

Пара реакций, таких, как фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат и обратный гидролиз последнего до фруктозо-6-фосфата, называется *субстратным циклом.* Как уже упоминалось, в большинстве клеток эти реакции никогда не осуществляются с максимально возможной скоростью одновременно в силу реципрокного аллостерического контроля. Однако исследования с применением изотопной метки показали, что в ходе глюконеогенеза имеет место фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат. Ограниченное функционирование таких циклов обнаружено и в случае других пар противоположно направленных необратимых реакций. Наличие таких циклов объясняли несовершенством метаболической регуляции, и субстратные циклы называли иногда бесполезными, или *холостыми, циклами.* Однако в настоящее время представляется более вероятным, что субстратные циклы имеют определенное биологическое значение. Одна из возможностей состоит в том, что *эти циклы амплифицируют биологические сигналы.* Предположим, что скорость превращения A в B равняется 100, а B в A – 90, так что начальный «чистый» выход реакции составляет 10. Примем, что аллостерический эффектор повышает скорость реакции A $\rightarrow$ $\rightarrow$ B на 20% (до 120) и реципрокно снижает скорость реакции B $\rightarrow$ A на 20% (до 72). Новый «чистый выход» равен 48. Таким образом, изменение на 20% скоростей противоположно направленных реакций приводит к повышению «чистого выхода»



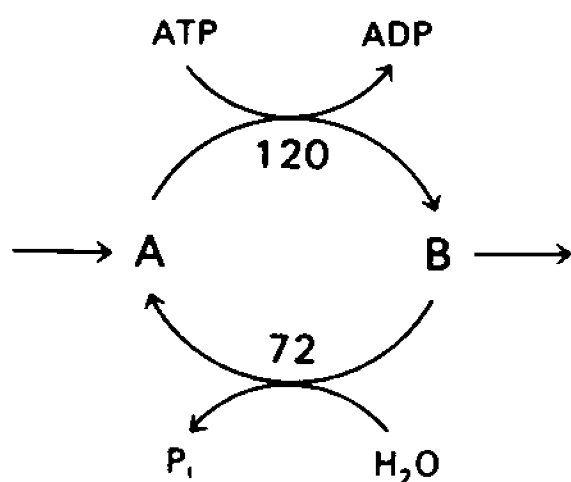


Рис. 15.7. Пример стимулированного ATP субстратного цикла, функционирующего с двумя различными скоростями. Небольшое изменение скоростей двух противоположно направленных реакций приводит к значительному изменению *чистого* выхода продукта B.

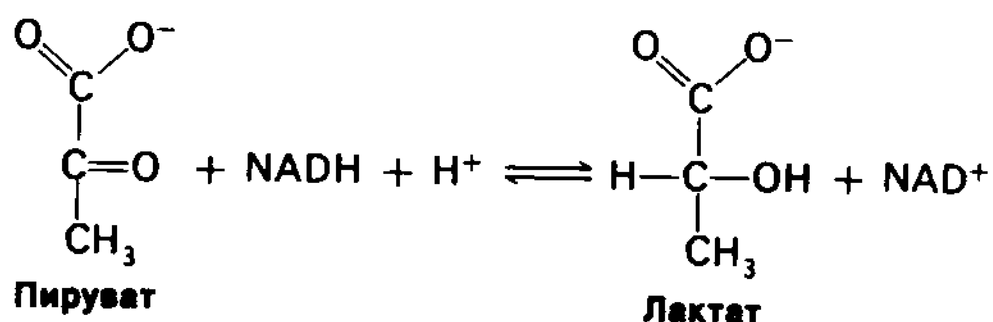
процесса на 480%. В примере, представленном рис. 15.7, такая амплификация достигается путем гидролиза ATP.

Другая потенциальная биологическая роль субстратных циклов состоит в том, чтобы *генерировать тепло, продуцируемое при гидролизе ATP.* Ярким примером такого феномена служат шмели, которым для полета необходимо поддерживать температуру грудного отдела около 30°C. Шмели способны поддерживать такую высокую температуру грудного отдела и осуществлять поиск пищи даже при температуре всего 10°C, потому что их летательная мышца обладает высокой активностью и фосфофруктокиназы, и фруктозобисфосфатазы. Поскольку эта фруктозобисфосфатаза не ингибируется AMP, есть основание думать, что данный фермент специально предназначен для генерирования тепла. В летательной мышце медоносной пчелы в отличие от мышцы шмеля фруктозобисфосфатазная активность почти отсутствует, и в соответствии с этим пчела не может летать при низкой окружающей температуре. Слишком большая скорость цикла фруктозо-6-фосфат $\rightleftharpoons$ фруктозо-1,6-бисфосфат может вызывать избыточное образование тепла. Такое состояние, называемое *злокачественной гипертермией*, вызывается анестетиком галотаном у чувствительной к нему линии свиней.

15.21. Лактат, образованный сокращающейся мышцей, превращается в печени в глюкозу

Основным сырьем для глюконеогенеза является лактат, образованный активной скелетной мышцей. В сокращающейся скелетной мышце при анаэробных условиях скорость образования пирувата в ходе гликолиза превышает скорость его окисления в цикле трикарбоновых кислот. Более того, скорость образования NADH при гликолизе выше, чем скорость его окисления в дыхательной цепи. Продолжение гликолиза зависит от наличия NAD^+ для окисления глицеральдегид-3-фосфата, а генерирование NAD^+ осуществляется лактат-дегидрогеназой, которая, восстанавливая пируват в лактат, окисляет NADH в NAD^+.

Лактат–это тупик в метаболизме. Для дальнейших метаболических превращений он должен быть сначала снова превращен в пируват.



Единственная цель восстановления пирувата в лактат–это регенерирование NAD^+, необходимого для осуществления гликолиза в активной скелетной мышце. *Образование лактата занимает время и перекладывает часть метаболической нагрузки с мышц на печень.*

Плазматические мембраны большинства клеток обладают высокой проницаемостью для лактата и пирувата. Оба соединения диффундируют из активной склетной мышцы в кровь и переносятся в печень. При этом переносится значительно больше лактата, чем пирувата, из-за высокого значения отношения

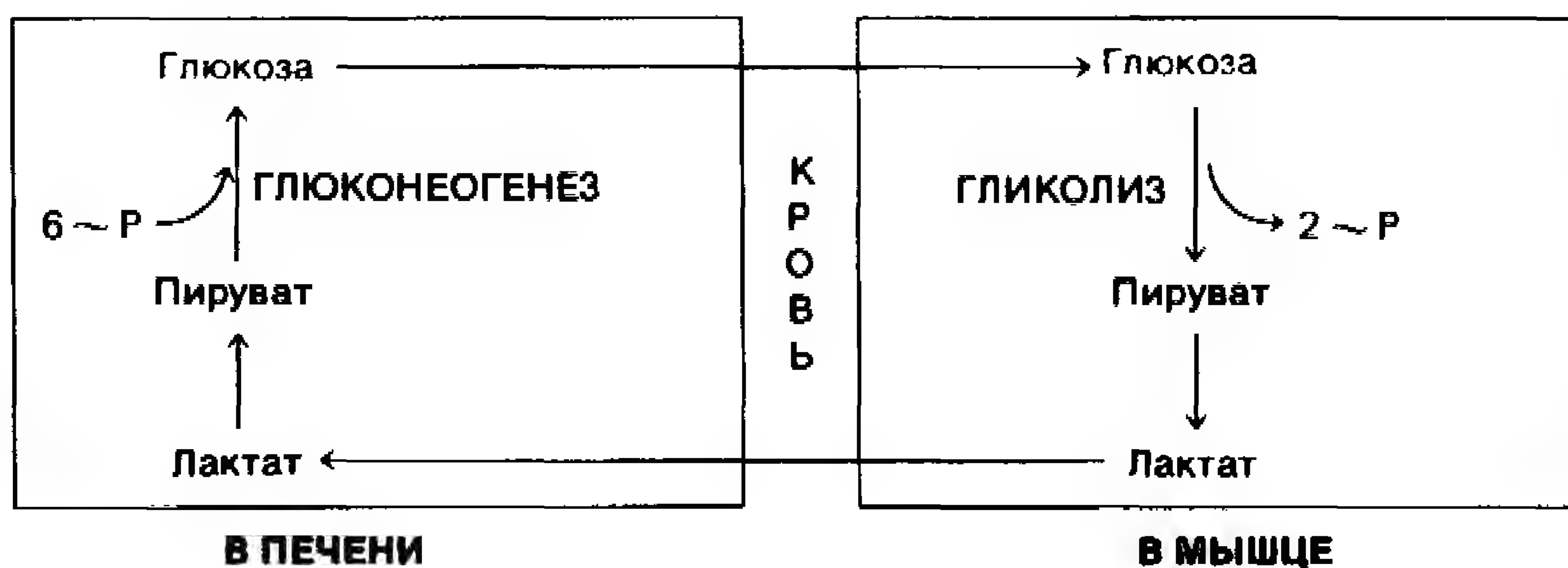


Рис. 15.8. Цикл Кори. Лактат, образованный активной мышцей, превращается в печени в глюкозу. Этот цикл передает часть метаболического «груза» активной мышцы в печень.

[NADH]/[NAD^+] в сокращающейся скелетной мышце. Лактат, поступивший в печень, окисляется в пируват, чему благоприятствует низкое отношение [NADH]/[NAD^+] в цитозоле печени. Пируват затем превращается в печени в глюкозу по пути глюконеогенеза. Глюкоза поступает далее в кровь и поглощается скелетными мышцами. Таким образом *печень снабжает глюкозой сокращающиеся мышцы, которые получают ATP в результате гликолитического превращения глюкозы в лактат. Затем происходит синтез глюкозы из лактата в печени. Эти превращения составляют цикл Кори* (рис. 15.8).

Описанные процессы облегчаются различиями в каталитических свойствах лактатдегидрогеназ в мышцах и печени. Лактатдегидрогеназа представляет собою тетрамер из субъединиц мол. массой 35 кДа. Существуют два вида полипептидных цепей, обозначаемых М и Н, которые могут образовывать пять типов тетрамеров: M_4, M_3H, M_2H_2, M_1H_3 и H_4. Эти формы называются *изоферментами* (или изозимами). Изофермент M_4 обладает значительно большим сродством к пирувату, чем изофермент H_4, остальные изоферменты имеют промежуточную активность. Изоферменты лактат-дегидрогеназы подвергались интенсивному изучению, однако причина существования множественных форм фермента до сих пор является загадкой.

Заключение

В результате пентозофосфатного пути происходит генерирование NADPH и рибозо-5-фосфата в цитозоле. NADPH участвует в восстановительных биосинтезах, а рибозо-5-фосфат используется в синтезе РНК, ДНК и нуклеотидных коферментов. Пентозофосфатный путь начинается с дегидрирования глюкозо-6-фосфата с образованием лактона, который гидролизуется, давая 6-фосфоглюконат, и затем подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием рибулозо-5-фосфата. Акцептором электронов в обеих окислительных реакциях служит $NADP^+$. Последняя стадия – изомеризация рибулозо-5-фосфата (кетозы) в рибозо-5-фосфат (альдозу). Когда в клетках потребность в NADPH оказывается выше потребности в рибозо-5-фосфате, активируется другой механизм процесса. При этих условиях рибозо-5-фосфат превращается в глицеральдегид-3-фосфат и фруктозо-6-фосфат под действием транскетолазы и трансальдолазы. Транскетолаза содержит в качестве простетической группы ТПФ. Эти ферменты создают обратимую связь между пентозофосфатным путем и гликолизом. Промежуточными продуктами в указанных взаимопревращенияхх являются ксилулозо-5-фосфат, седогептулозо-7-фосфат и эритрозо-4-фосфат. Таким путем может генерироваться 12 молекул NADPH в расчете на каждую молекулу глюкозо-6-фосфата, которая полностью окисляется до CO_2. Когда потребность в синтезе рибозо-5-фосфата значительно превышает потребность в NADPH, активна только неокислительная ветвь данного пути. В таких условиях фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат (образованные по гликолитическому пути) превращаются в рибозо-5-фосфат без образования NADPH. Рибозо-5-фосфат, образованный по окислительной ветви, также может превращаться в пируват через фруктозо-6-фосфат и глицеральде-

гид-3-фосфат. При этом генерируются ATP и NADPH, а пять из шести углеродных атомов глюкозо-6-фосфата появляются в пирувате. Взаимодействие гликолитического и пентозофосфатного путей обеспечивает возможность постоянного приспособления концентраций NADPH, ATP и строительных блоков, например рибозо-5-фосфата и пирувата, для удовлетворения потребностей клеток.

Глюконеогенез – это синтез глюкозы из неуглеводных предшественников, таких, как лактат, аминокислоты и глицерол. Некоторые реакции превращения в глюкозу пирувата, основного «пункта входа», являются общими для глюконеогенеза и гликолиза. Однако для осуществления глюконеогенеза требуются четыре новые реакции – в обход необратимости соответствующих реакций гликолиза. Пируват карбоксилируется в митохондриях в оксалоацетат, который в свою очередь подвергается декарбоксилированию и фосфорилированию в фосфоенолпируват в цитозоле. В этих реакциях, катализируемых пируват-карбоксилазой и фосфоенолпируват-карбоксикиназой, потребляются две высокоэнергетические фосфатные связи. Пируват-карбоксилаза содержит в качестве простетической группы биотин. Две другие специфические реакции глюконеогенеза – это реакции гидролиза фруктозо-1,6-бисфосфата и глюкозо-6-фосфата, которые катализируются специфическими фосфатазами. Глюконеогенез и гликолиз регулируются реципрокно, так что если активность одного из путей относительно понижается, то активность другого пути повышается.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Horecker B. L., 1976. Unravelling the pentose phosphate pathway. In: Kornberg A., Cornudella L., Horecker B. L. and Oro J. (eds.), Reflections on Biochemistry, pp. 65–72, Pergamon.

Обзоры по пентозофосфатному пути и глюконеогенезу

Pontremoli S., Grazi E., 1969. Hexose monophosphate oxidation, Compr. Biochem., **17**, 163–189.

Pontremoli S., Grazi E., 1968. Gluconeogenesis. In: Dickens F., Randle P. J., Whelan W. J. (eds.), Carbonydrate Metabolism and Its Disorders, vol. 1, pp. 259–295, Academic Press.

Ферменты и механизмы реакций

Horecker B. L., 1964. Transketolase and transaldolase, Compr. Biochem., **15**, 48–70.

Scrutton M. C., Young M. R., 1972. Pyruvate carboxylase. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 6, pp. 1–35, Academic Press.

Wood H. G., Barden R. E., 1977. Biotin enzymes, Ann. Rev. Biochem., **46**, 385–414.

Schultz G. E., Schirmer R. H., Sachsenheimer W., Pai E. F., 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase, Nature, **273**, 120–124.

Регуляция

Newsholme E. A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism, Wiley. (В гл. 6 рассматривается регуляция гликолиза и глюконеогенеза в печени и корковом слое почек.)

Soling H. D., Willms B. (eds.), 1971. Regulation of Gluconeogenesis, Academic Press.

Newsholme E. A., Crabtree B., 1976. Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation, Biochem. Soc. Symp., **41**, 61–109.

Katz J., Rognstad R., 1976. Futile cycles in the metabolism of glucose, Curr. Topics Cell Reg., **10**, 238–287.

Nordlie R. C., 1974. Metabolic regulation by multifunctional glucose-6-phosphatase, Curr. Top. Cell Regul., **8**, 33–111.

Ureta T., 1978. The role of isozymes in metabolism: A model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes, Curr. Top. Cell Regul., **13**, 233–250.

Генетические болезни

Beutler E., 1978. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Stanbury J. B., Wyngaarden J. B. and Fredrickson D. S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1430–1451, McGraw-Hill.

Luzzatto L., Usanga E. A., Reddy S., 1969. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites, Science, **164**, 839–842.

Blass J. P., Gibson G. E., 1977. Abnormality of a thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome, New Engl. J. Med., **297**, 1367–1370.

Вопросы и задачи

1. Какова стехиометрия синтеза рибозо-5-фосфата из глюкозо-6-фосфата без одновременного генерирования NADPH? Какова стехиометрия синтеза NADPH из глюкозо-6-фосфата без одновременного генерирования пентоз?
2. Глюкозу, меченную ^{14}C при С-6, добавляли в раствор, содержащий ферменты и кофакторы окислительной ветви пентозофосфатного пути. Какова судьба радиоактивной метки?
3. Какая реакция цикла трикарбоновых кислот в наибольшей степени аналогична окислительному декарбоксилированию 6-фосфоглюконата в рибулозо-5-фосфат? Какого рода связанный с ферментом промежуточный продукт образуется при обеих реакциях?
4. Рибозо-5-фосфат, меченный ^{14}C при С-1, добавлен в раствор, содержащий транскетолазу, трансальдолазу, фосфопентозо-эпимеразу, фосфопентозо-изомеразу и глицеральдегид-3-фосфат. Каково распределение радиоактивной метки в эритрозо-4-фосфате и фруктозо-6-фосфате, образующихся в этой реакционной смеси?
5. Авидин, белок яичного белка в 70 кДа, обладает очень высоким сродством к биотину. Он является сильным специфическим ингибитором биотиновых ферментов. Какое из нижеприведенных превращений будет блокироваться при добавлении авидина к клеточному гомогенату?

а) Глюкоза → Пируват.
б) Пируват → Глюкоза.
в) Оксалоацетат → Глюкоза.
г) Глюкоза → Рибозо-5-фосфат.
д) Пируват → Оксалоацетат.
е) Рибозо-5-фосфат → Глюкоза.

6. Назовите химические эксперименты по идентификации остатка лизина, образующего шиффово основание в активном центре трансальдолазы.

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benlow R. M., Hood L. E., Biochemistry: A Problems Approach (Benjamin, 1979). гл 9.

ГЛАВА 16
Гликоген и обмен дисахаридов

Гликоген является *легкомобилизуемой резервной формой глюкозы.* Он представляет собою очень большой разветвленный полимер, состоящий из остатков глюкозы (рис. 16.1). Большинство остатков глюкозы в гликогене связаны α-1,4-гликозидными связями. Ветвление создается α-1,6-гликозидными связями; на каждые десять остатков приходится примерно одна такая связь.

Наличие гликогена намного увеличивает количество глюкозы, легко доступной для использования организмом во время интервалов между приемами пищи или в период мышечной активности. Содержание энергии в глюкозе жидкостей тела человека со средним весом 70 кг составляет всего 40 ккал, тогда как для общего гликогена тела эта величина превышает 600 ккал, даже после ночного голодания. В организме гликоген накапливается главным образом в печени и скелетных мышцах. Концентрация гликогена в печени выше, чем в мышцах, но в целом запасы гликогена в скелетных мышцах, ввиду их значительно большей массы, превышают его запасы в печени. Гликоген присутствует в цитозоле в форме гранул диаметром, колеблющимся в диапазоне от 100 до 400 Å. Такое различие в размерах гранул объясняется неодинаковым размером молекул гликогена; максимум распределения, как правило, приходится на массу в несколько тысяч килодальтон. На электронных микрофотографиях гликогеновые гранулы выглядят плотными (рис. 16.3). Они содержат ферменты, катализирующие синтез и распад гликогена, а также некоторые ферменты, регулирующие эти процессы. Гликогеновые гранулы отличаются, однако, от мультиферментных комплексов (например, от пируват-дегидрогеназного комплекса), в которых отсутствуют определенные стехиометрические соотношения связанных ферментов. Кроме того, степень структурной организации гликогеновых гранул ниже, чем в мультиферментных комплексах.

Синтез и распад гликогена рассматриваются нами здесь детально по ряду соображений. Во-первых, эти процессы имеют большое значение в том отношении, что они *регулируют содержание глюкозы в крови* и создают *резерв глюкозы* для интенсивной мышечной активности. Во-вторых, синтез и распад гликогена осуществляются *разными метаболическими путями,* что является иллюстрацией одного из важных принципов биохимии. В-третьих, гормональная регуляция обмена гликогена опосредуется механизмами, имеющими общее значение. Хорошо изучена *роль циклического аденозинмонофосфата* (циклического AMP) в координированном контроле синтеза и распаде гликогена. Это открывает возможность проникновения в механизм действия гормонов в ряде других систем. В-четвертых, охарактеризованы некоторые наследственные дефекты ферментов, приводящие к нарушению обмена гликогена. Некоторые из этих *болезней накопления гликогена* приводят к летальному исходу уже в раннем детстве, другие характеризуются относительно благополучным клиническим течением. Последняя часть данной главы посвящена метаболизму обычных дисахаридов: *лактозы, мальтозы и сахарозы.*

16.1. Фосфорилаза катализирует фосфоролитическое расщепление гликогена до глюкозо-1-фосфата

Путь распада гликогена был раскрыт благодаря изящным исследованиям Карла и Герти Кори (Carl Cori, Gerty Cori). Они

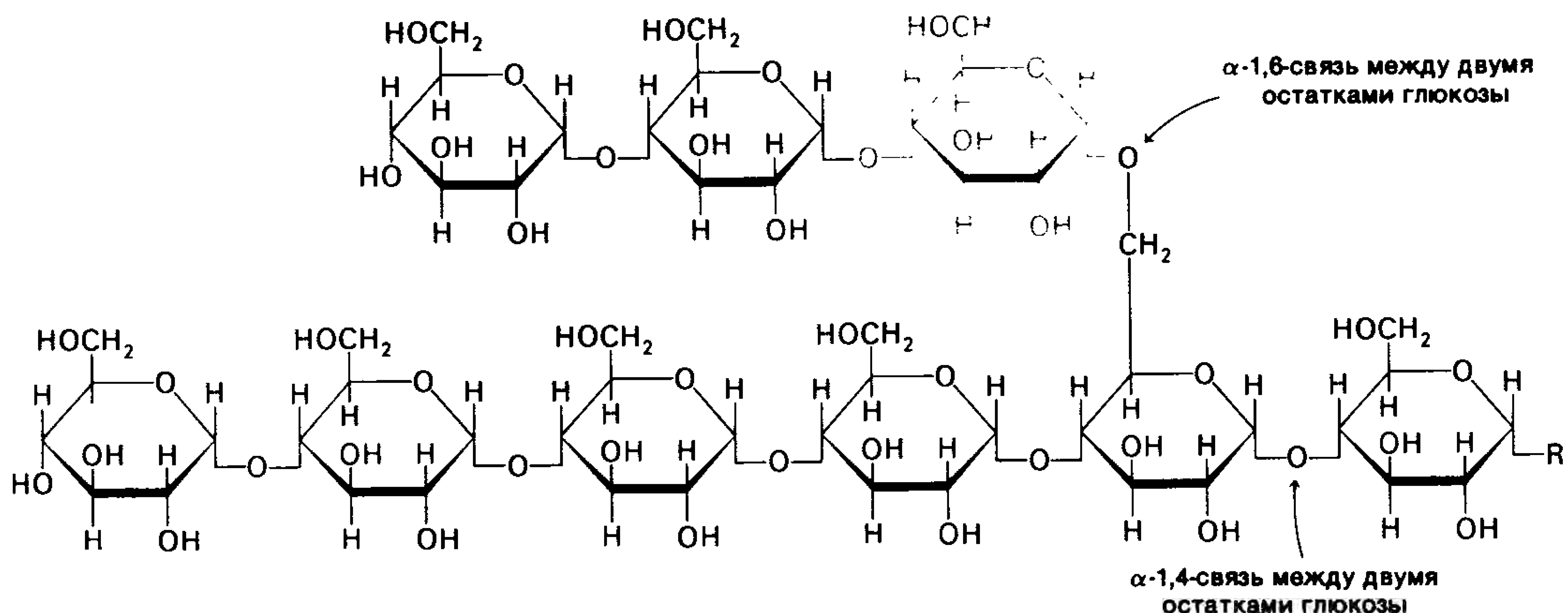


Рис. 16.1. Структура двух наружных ветвей частицы гликогена. Остатки на невосстановленных концах показаны красным цветом, остатки, с которых начинается ветвь,– синим. Остальная часть молекулы гликогена обозначена символом R.

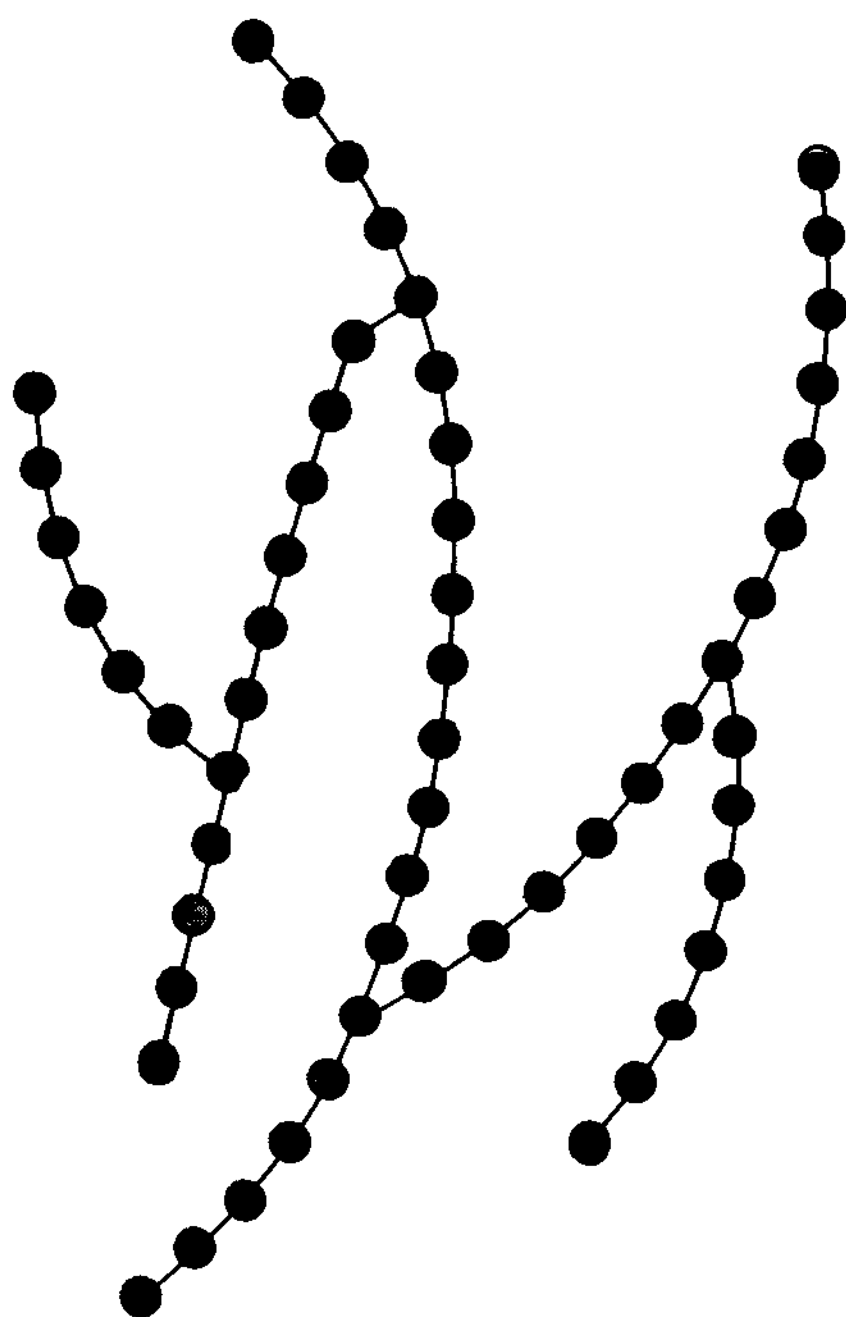
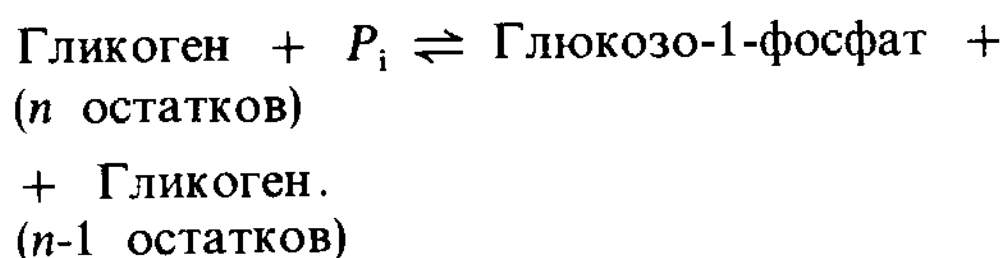


Рис. 16.2. Схематическое изображение поперечного разреза молекулы гликогена. Концевые остатки показаны красным цветом, остатки, с которых начинается ветвь,– зеленым.

показали, что гликоген *расщепляется ортофосфатом*, давая новый вид фосфорилированного сахара, идентифицированный ими как *глюкозо-1-фосфат*. Кори также выделили и получили в кристаллическом виде *гликоген-фосфорилазу*, фермент, катализирующий эту реакцию.



$$\underset{(n\ \text{остатков})}{\text{Гликоген}} + P_i \rightleftharpoons \text{Глюкозо-1-фосфат} + \underset{(n\text{-1 остатков})}{\text{Гликоген}}.$$

Фосфорилаза катализирует последовательное удаление гликозильных остатков с невосстанавливающего конца молекулы гликогена. Ортофосфат расщепляет гликозидную связь между С-1 концевого остатка и С-4 соседнего остатка. Он специфически разрывает связь между углеродным атомом С-1 и гликозидным атомом кислорода с сохранением α-конфигурации при С-1.

Эта реакция, вероятно, идет через образование в качестве промежуточного продукта иона карбония. Расщепление связи между С-1 и О, сохранение конфигурации при С-1 и предположительное участие промежуточного иона карбония напоминают разрушение хитина, катализируемое лизоцимом.

Реакция, катализируемая фосфорилазой, in vitro легко обратима. При pH 6,8 равновесное отношение ортофосфата к глюкозо-1-фосфату равно 3,6. $\Delta G^{0'}$ для этой реакции мало, потому что гликозидная связь замещается фосфоэфирной связью, которая имеет почти такой же потенциал переноса. Однако in vivo фосфоролиз сдвинут далеко в сторону распада гликогена, поскольку отношение $[P_i]/[\text{Глюкозо-1-фосфат}]$ обычно превышает 100.

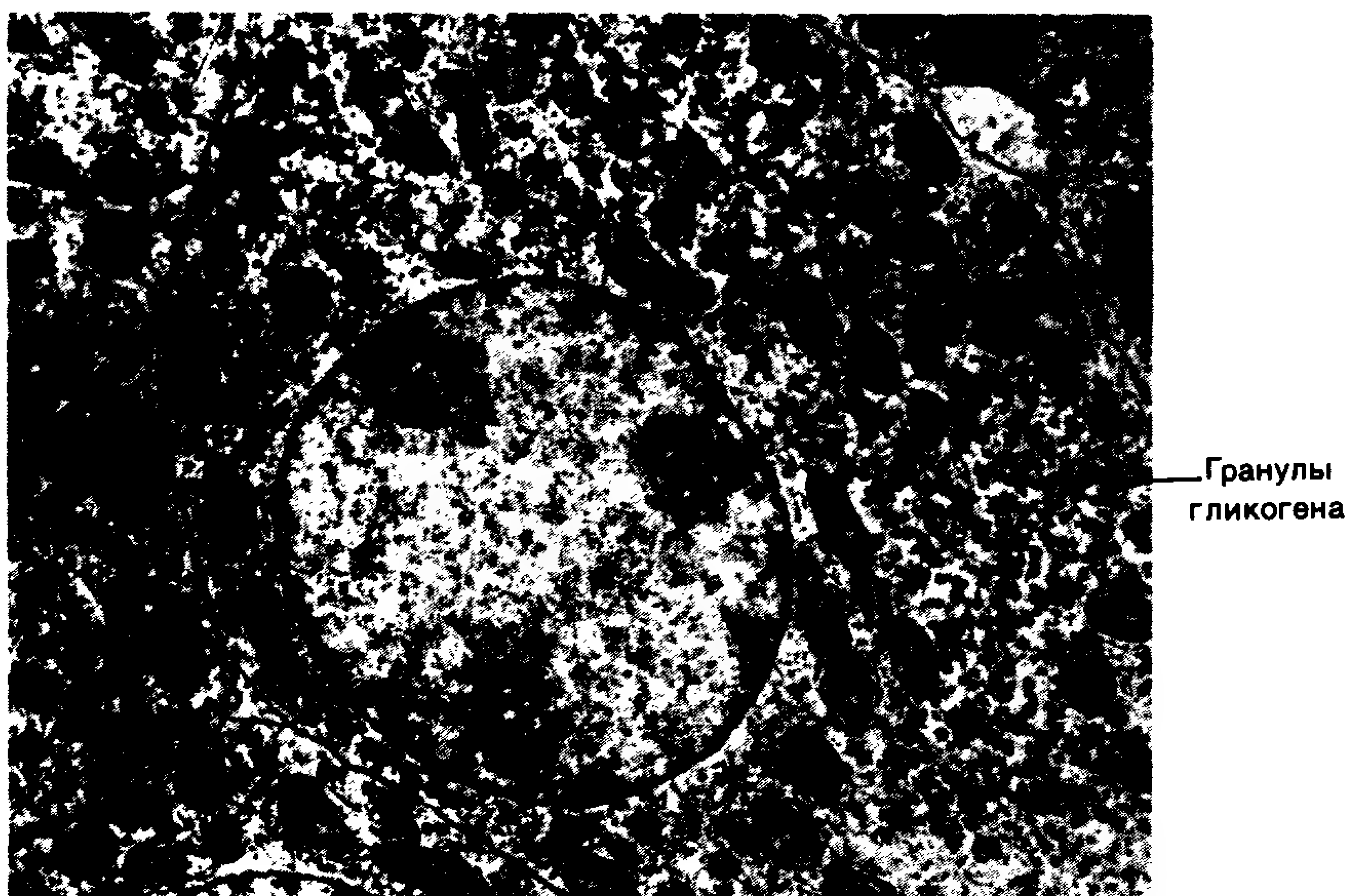


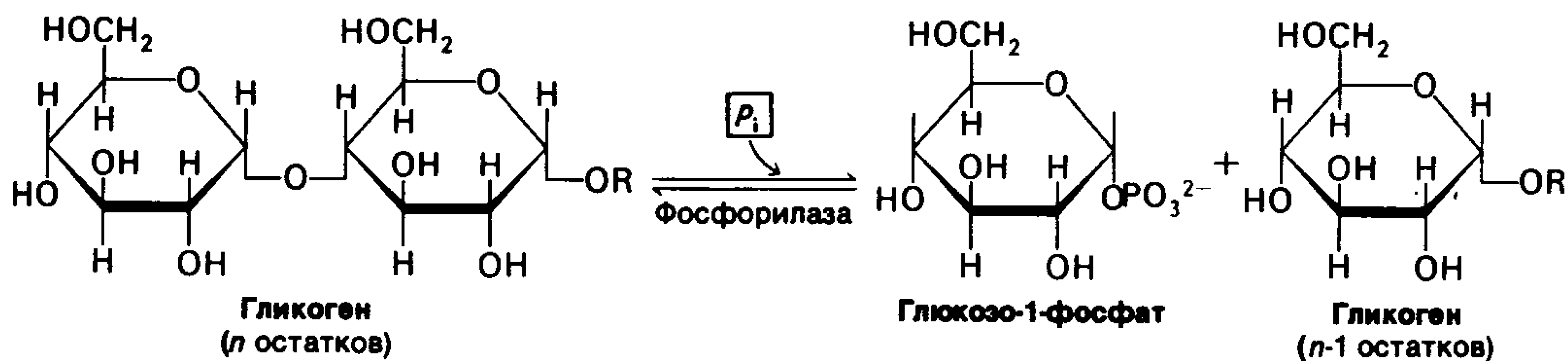
Рис. 16.3. Электронная микрофотография печеночной клетки. Плотные частицы в цитоплазме представляют собой гранулы гликогена. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

Фосфоролитическое расщепление гликогена энергетически выгодно, потому что высвобождаемый сахар уже фосфорилирован. В противоположность этому гидролитическое расщепление давало бы глюкозу, которая для вступления на гликолитический путь должна была фосфорилироваться за счет АТР. Дополнительное преимущество фосфоролитического распада состоит в том, что глюкозо-1-фосфат в отличие от глюкозы не может диффундировать из клетки. Каково значение способности мышцы удерживать фосфорилированный сахар, мы увидим несколько позднее.

16.2. Для распада гликогена необходим также фермент, разрывающий связи в местах ветвления

Под действием одной только фосфорилазы гликоген распадается в ограниченной степени. α-1,6-гликозидные связи в точках ветвления нечувствительны к расщеплению фосфорилазой, поскольку ее действие на α-1,4-связи приостанавливается по достижении концевого остатка, отстоящего от точки ветвления на четыре остатка. Действие фосфорилазы на две внешние ветви гликогеновой частицы показано на рис. 16.4. Пять α-1,4-гликозидных связей на одной ветви и три на другой расщепляют-

Фосфоролиз – расщепление связи ортофосфатом (в отличие от *гидролиза*, означающего расщепление водой).



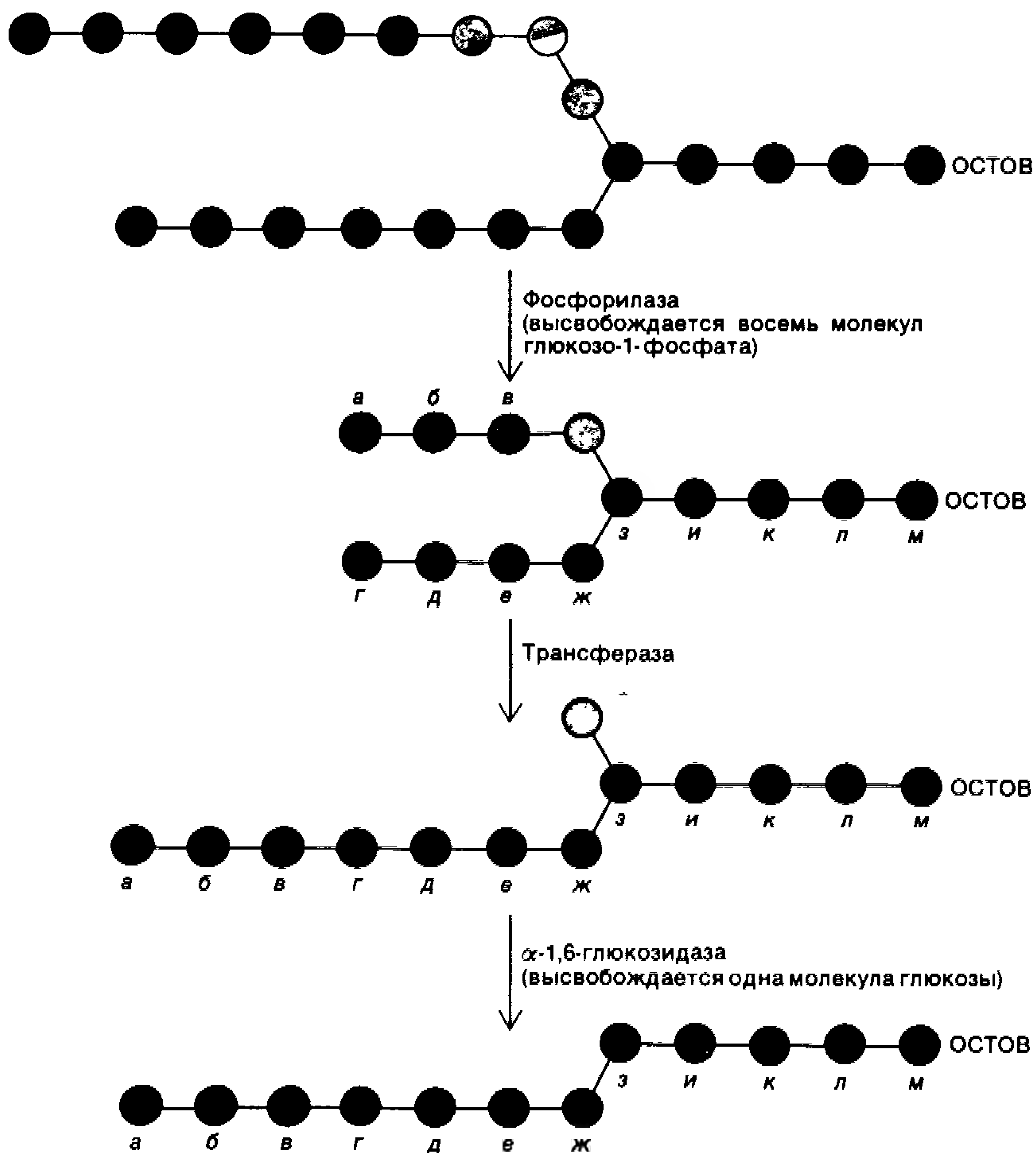


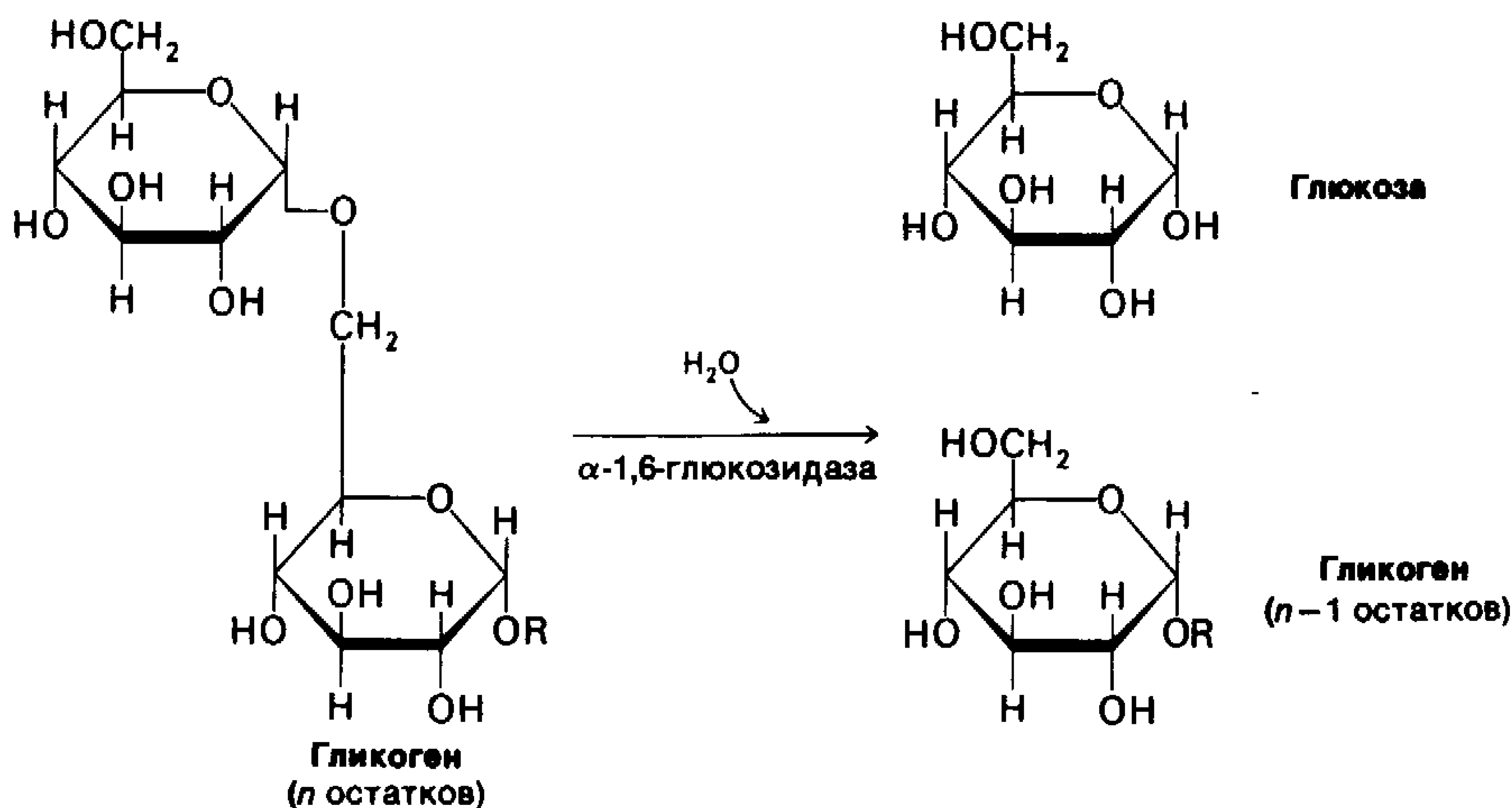
Рис. 16.4. Стадии расщепления гликогена.

ся фосфорилазой. На этой стадии процесс приостанавливается, поскольку концевые остатки *а* и *г* удалены от точки ветвления *з* на четыре остатка. На этом этапе требуется подключение новой ферментативной активности. *Трансфераза переносит блок из трех гликозильных остатков с одной внешней ветви на другую.* α-1,4-гликозидная связь между *в* и Z разрывается и образуется новая α-1,4-связь между *в* и *г*. В результате такого переноса остаток Z обнажается и становится доступным действию третьего деградирующего фермента, *α-1,6-глюкозидазы*, известной также как *дебранчинг-фермент.* Этот фермент гидролизует α-1,6-гликозидную связь между остатками Z и *з*.

Таким образом, трансфераза и фермент, разрывающий связи в местах ветвления (α-1,6-глюкозидаза), превращают разветвленную структуру в линейную, что прокладывает путь для дальнейшего расщепления молекулы фосфорилазой. В результате отщепления Z все остатки от *а* до *м* становятся чувствительными к фосфорилазе. Интересно отметить, что одна полипептидная цепь в 160 кДа содержит и трансферазный, и α-1,6-глюкозидазный активные центры.

16.3. Фосфоглюкомутаза превращает глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат

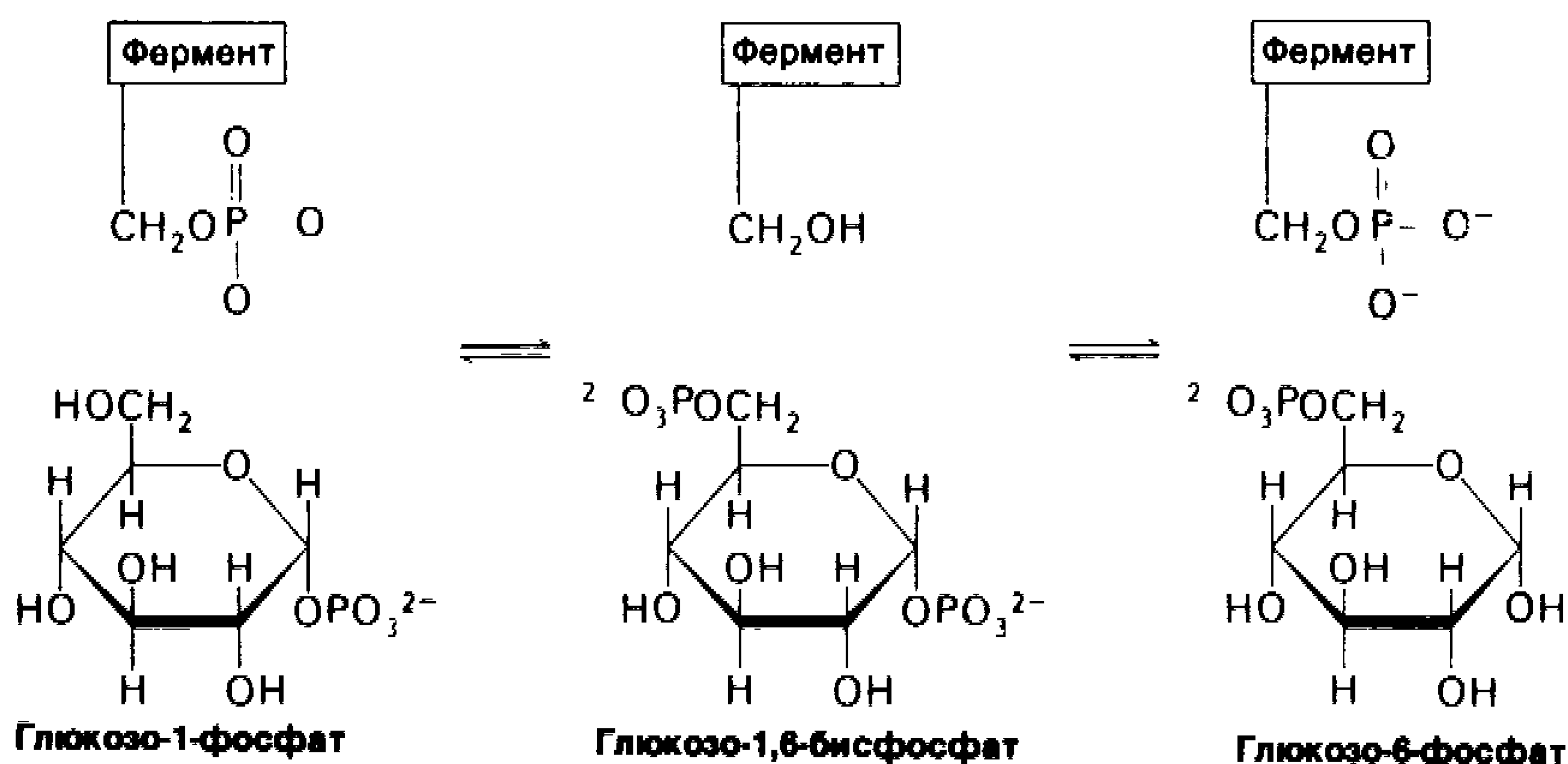
Глюкозо-1-фосфат, образовавшийся при фосфоролитическом расщеплении гликогена, превращается под действием *фосфоглюкомутазы* в глюкозо-6-фосфат. Равновесная смесь содержит 95% глюкозо-6-фосфата. В каталитическом центре активной молекулы фермента присутствует фосфорилированный остаток серина. Во время катализа эта фосфорильная группа, вероят-



но, переносится на гидроксильную группу при С-6 глюкозо-1-фосфата с образованием глюкозо-1,6-бисфосфата. Далее фосфорильная группа указанного промежуточного продукта переносится на остаток серина в активном центре. В результате происходит образование глюкозо-6-фосфата и регенерирование фосфорилированного фермента.

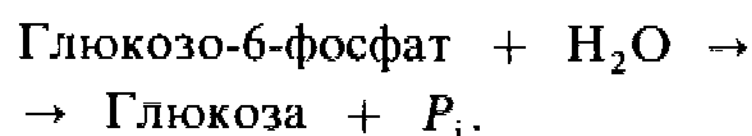
16.4. Печень содержит глюкозо-6-фосфатазу, гидролитический фермент, отсутствующий в мышцах

Главная функция печени – это поддерживать содержание глюкозы в крови на относительно постоянном уровне. Печень высвобождает глюкозу в кровь в период мышечной активности и в интервалах между приемами пищи. Высвобождаемая глю-



Фосфорильная группа мутазы медленно теряется в процессе гидролиза. Она восстанавливается благодаря переносу фосфорильной группы от глюкозо-1,6-бисфосфата, который образуется из глюкозо-1-фосфата и АТР в реакции, катализируемой фосфоглюкокиназой. Эти процессы подобны реакциям, катализируемым гликолитическим ферментом *фосфоглицеромутазой* (разд. 12.7). Роль 2,3-бисфосфоглицерата (2,3-БФГ) во взаимопревращении 2-фосфоглицерата и 3-фосфоглицерата подобна таковой глюкозо-1,6-бисфосфата во взаимопревращениях фосфоглюкоз. Кроме того, в обеих реакциях промежуточным продуктом служит фосфорилированный фермент.

коза поглощается преимущественно мозгом и скелетными мышцами. Фосфорилированная глюкоза в противоположность неэтерифицированной глюкозе не может легко диффундировать из клеток. Печень содержит гидролитический фермент *глюкозо-6-фосфатазу*, который и обеспечивает возможность выхода глюкозы из этого органа. Этот фермент играет важную роль в глюконеогенезе (разд. 15.14).

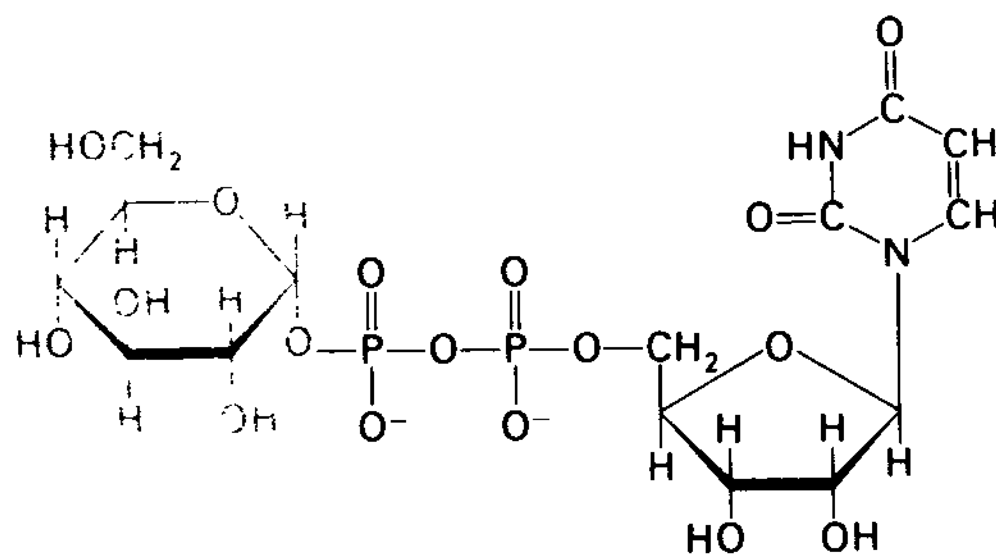

Глюкозо-6-фосфат + H_2O →
→ Глюкоза + P_i.

Глюкозо-6-фосфатаза имеется также в почках и кишечнике, но *ее нет в мышцах и мозгу.* Следовательно, глюкозо-6-фосфат задерживается мышцами и мозгом, которые нуждаются в больших количествах этого топлива для генерирования ATP. В то же время для печени глюкоза не является главным топливом. Печень запасает и высвобождает глюкозу прежде всего для удовлетворения потребности в ней других тканей (разд. 23.5).

16.5. Синтез и расщепление гликогена происходят различными путями

Реакция, катализируемая гликоген-фосфорилазой, легко обратима, потому что $\Delta G^{0'}$ для элонгации гликогена с участием глюкозо-1-фосфата составляет −0,5 ккал/моль. Действительно, Кори удалось синтезировать гликоген из глюкозо-1-фосфата с использованием фосфорилазы и ветвящего фермента. Однако ряд последующих экспериментальных исследований показал, что in vivo гликоген синтезируется иным путем. Во-первых, реакция, катализируемая фосфорилазой, находится в состоянии равновесия, когда отношение $[P_i]$/[Глюкозо-1-фосфат] равно 3,6 при нейтральном значении pH, тогда как в клетках это отношение обычно превышает 100. Следовательно, in vivo фосфорилазная реакция должна идти в направлении распада гликогена. Во-вторых, гормоны, вызывающие повышение активности фосфорилазы, обычно усиливают распад гликогена. В-третьих, больные с полным отсутствием в мышцах фосфорилазы [болезнь Мак-Ардля (McArdle)] (разд. 16.19) способны к синтезу мышечного гликогена.

В 1957 г. Луи Лелуа (Luis Leloir) и его сотрудники показали, что синтез гликогена происходит другим путем. Донором гликозильной группы служит уридиндифосфатглюкоза (UDP-глюкоза), а не глюкозо-1-фосфат. *Реакция синтеза гликогена – это не*



Уридиндифосфатглюкоза (UDP-глюкоза)

обращенная реакция его расщепления:

Синтез: Гликоген$_n$ + UDP-глюкоза →
→ Гликоген$_{n+1}$ + UDP.

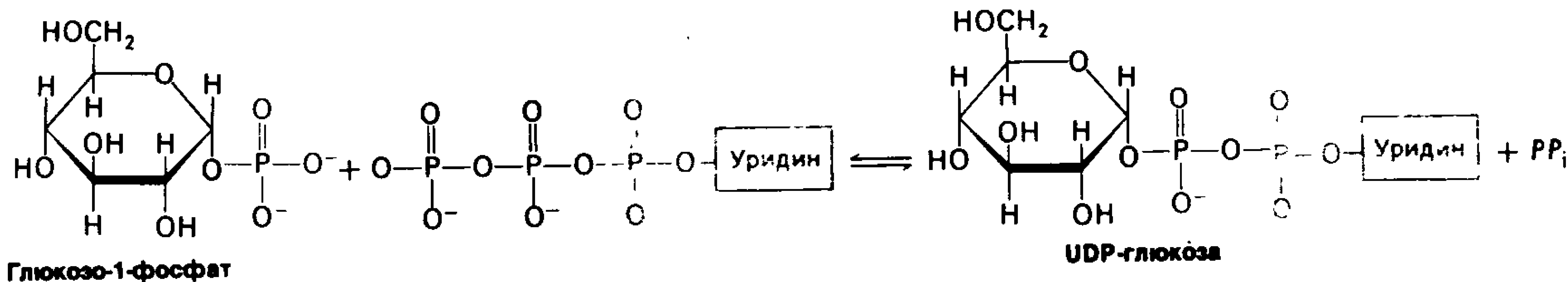
Распад: Гликоген$_{n+1}$ + P_i →
→ Гликоген$_n$ + Глюкозо-1-фосфат.

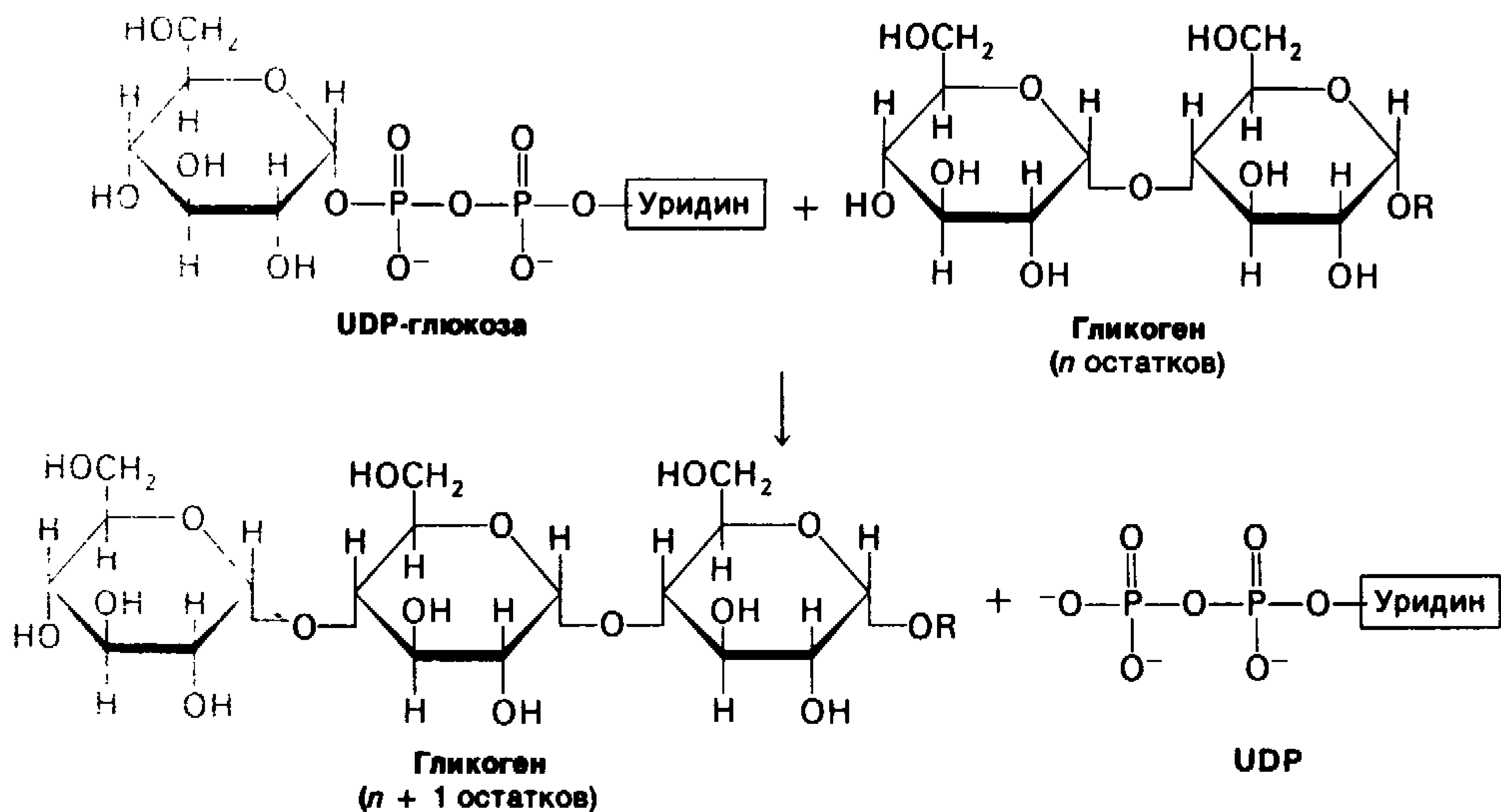
Мы знаем теперь, что *пути биосинтеза и расщепления в биологических системах* почти всегда различны. Обмен гликогена — первый пример этого важного принципа. *Существование раздельных путей синтеза и распада обеспечивает значительно бо́льшую гибкость процессов, как в энергетическом, так и в регуляторном плане.* Клетка не отдается больше только «на милость» закона действия масс. Гликоген может синтезироваться вопреки высокому соотношению [Ортофосфат]/[Глюкозо-1-фосфат].

16.6. UDP-глюкоза – активированная форма глюкозы

UDP-глюкоза, донор глюкозы в биосинтезе гликогена, представляет собою *активированную форму глюкозы*, аналогично тому как ATP и ацетил-CoA являются активированными формами ортофосфата и ацетата соответственно. Атом углерода C-1 гликозильного компонента UDP-глюкозы активирован, потому что его гидроксильная группа образует эфирную связь с дифосфатным компонентом UDP.

UDP-глюкоза синтезируется из глюкозо-1-фосфата и уридинтрифосфата (UTP) в ходе реакции, катализируемой *UDP-глю-*





козо-пирофосфорилазой. Пирофосфат, освобождающийся при этой реакции, происходит из двух обращенных наружу фосфорильных остатков UTP.

Реакция легко обратима, но пирофосфат быстро гидролизуется in vivo в ортофосфат неорганической пирофосфатазой. Необратимый по своей природе гидролиз пирофосфата запускает синтез UDP-глюкозы.

Глюкозо-1-фосфат + UTP $\rightleftharpoons$

$\rightleftharpoons$ UDP-глюкоза + PP_i,

$PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$

Глюкозо-1-фосфат + UTP + H_2O $\rightarrow$

$\rightarrow$ UDP-глюкоза + $2P_i$

Синтез UDP-глюкозы может служить примером часто повторяющейся в биохимии темы: *многие реакции биосинтеза запускаются гидролизом пирофосфата*. Широкое значение имеет другой аспект этой реакции. Нуклеозиддифосфатные сахара служат донорами гликозильной группы в биосинтезе многих дисахаридов и полисахаридов.

16.7. Гликоген-синтаза катализирует перенос глюкозы от UDP-глюкозы к растущей цепи

Новые глюкозильные фрагменты присоединяются к невосстанавливающим концевым остаткам гликогена. Активированный глюкозильный компонент UDP-глюкозы переносится на гидроксильную группу С-4-конца гликогена, образуя α-1,4-гликозидную связь. В происходящей реакции элонгации UDP замещается этой концевой гидроксильной группой растущей молекулы гликогена. Реакция катализируется *гликоген-синтазой*, осуществляющей присоединение глюкозильных остатков только при условии, что полисахаридная цепь уже содержит более четырех остатков. Таким образом, для синтеза гликогена требуется наличие *затравки*, образуемой другой синтетазой.

16.8. Ветвящий фермент образует альфа-1,6-связи

Гликоген-синтаза катализирует только синтез α-1,4-связей. Для образования α-1,6-связей, благодаря которым гликоген становится разветвленным полимером, требуется другой фермент. *Ветвление имеет важное значение в том отношении, что оно повышает растворимость гликогена.* Кроме того, благодаря ветвлению создается большое количество невосстанавливающих концевых остатков, которые являются местами действия гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы. Таким образом, *ветвление увеличивает скорость синтеза и расщепления гликогена.*

Ветвление происходит после присоединения некоторого количества глюкозильных остатков через α-1,4-связь под действием гликоген-синтазы. Ветвь создается путем разрушения α-1,4-звена и образования α-1,6-звена, что представляет собой реакцию, отличную от реакции, устраняющей ветвление. Блок остатков, обычно в количестве семи, переносится ближе к внутренней части молекулы. *Ветвящий фермент*,

катализирующий эту реакцию, обладает очень строгой специфичностью. Блок, состоящий из семи (или около этого) остатков, должен включать в себя невосстанавливающий конец и происходить из цепи длиной минимум в одиннадцать остатков. Кроме того, новая точка ветвления должна быть отдалена от предсуществующей точки ветвления по меньшей мере на четыре остатка.

16.9. Гликоген – очень эффективная резервная форма глюкозы

Какова цена превращения глюкозо-6-фосфата в гликоген и обратного превращения гликогена в глюкозо-6-фосфат? Соответствующие реакции уже были описаны, за исключением приведенной ниже реакции 5, представляющей собою регенерацию UTP. UDP фосфорилируется за счет ATP в реакции, катализируемой *нуклеозид-дифосфокиназой.*

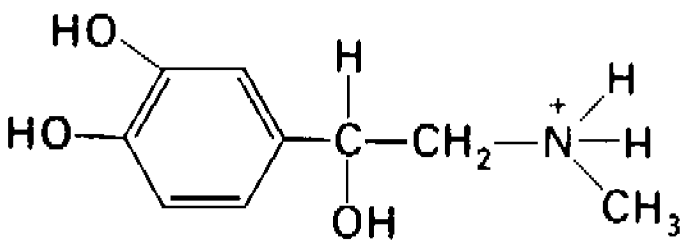
1) Глюкозо-6-фосфат →
   → Глюкозо-1-фосфат
2) Глюкозо-1-фосфат + UTP →
   → UDP-глюкоза + PP_i
3) PP_i + H_2O → $2P_i$
4) UDP-глюкоза + Гликоген$_n$ →
   → Гликоген$_{n+1}$ + UDP
5) UDP + ATP → UTP + ADP

Суммарная реакция: Глюкозо-6-фосфат + + ATP + Гликоген$_n$ + H_2O → → Гликоген$_{n+1}$ + ADP + $2P_i$

Таким образом, одна высокоэнергетическая фосфатная связь расходуется при включении глюкозо-6-фосфата в гликоген. Выход энергии при распаде гликогена чрезвычайно высок. Около 90% остатков подвергаются фосфоролитическому расщеплению с образованием глюкозо-1-фосфата, который превращается в глюкозо-6-фосфат без энергетических затрат. Остальные 10% остатков принадлежат ветвям и расщепляются гидролитически. Одна молекула ATP используется для фосфорилирования каждой из этих молекул глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Полное окисление глюкозо-6-фосфата дает тридцать семь молекул ATP, а при запасании потребляется чуть больше одной молекулы ATP на молекулу глюкозо-6-фосфата, так что *общая эффективность запасания составляет около 97%.*

16.10. Циклический AMP занимает центральное положение в координированном контроле синтеза и распада гликогена

Существование раздельных путей для синтеза и распада гликогена означает, что эти процессы должны подчиняться строгой регуляции. Полное проявление активности обеих групп реакций в одно и то же время привело бы к «непроизводительному» гидролизу ATP. В действительности *синтез и расщепление гликогена координированно регулируются таким образом, что гликоген-синтаза оказывается почти неактивной при полной активности фосфорилазы и наоборот.* На обмен гликогена большое влияние оказывают специфические гормоны. Полипептидный гормон *инсулин* (разд. 2.6) повышает способность печени синтезировать гликоген. Механизм действия инсулина пока не раскрыт. Высокое содержание инсулина в крови говорит о состоянии сытости, тогда как его низкое содержание является сигналом голода (разд. 23.6). Значительно лучше изучен механизм действия *адреналина* и *глюкагона*, эффект которых противоположен эффекту инсулина. Мышечная активность или подготовка к ней приводит к высвобождению адреналина мозговым веществом надпочечников. *Адреналин* выраженно стимулирует распад гликогена в мышцах и в меньшей степени – в печени. Печень более чувствительна к *глюкагону*, полипептидному гормону, секретируемому α-клетками поджелудочной железы при низком содержании сахара в крови. Глюкагон повышает содержание сахара в крови, стимулируя распад гликогена в печени.



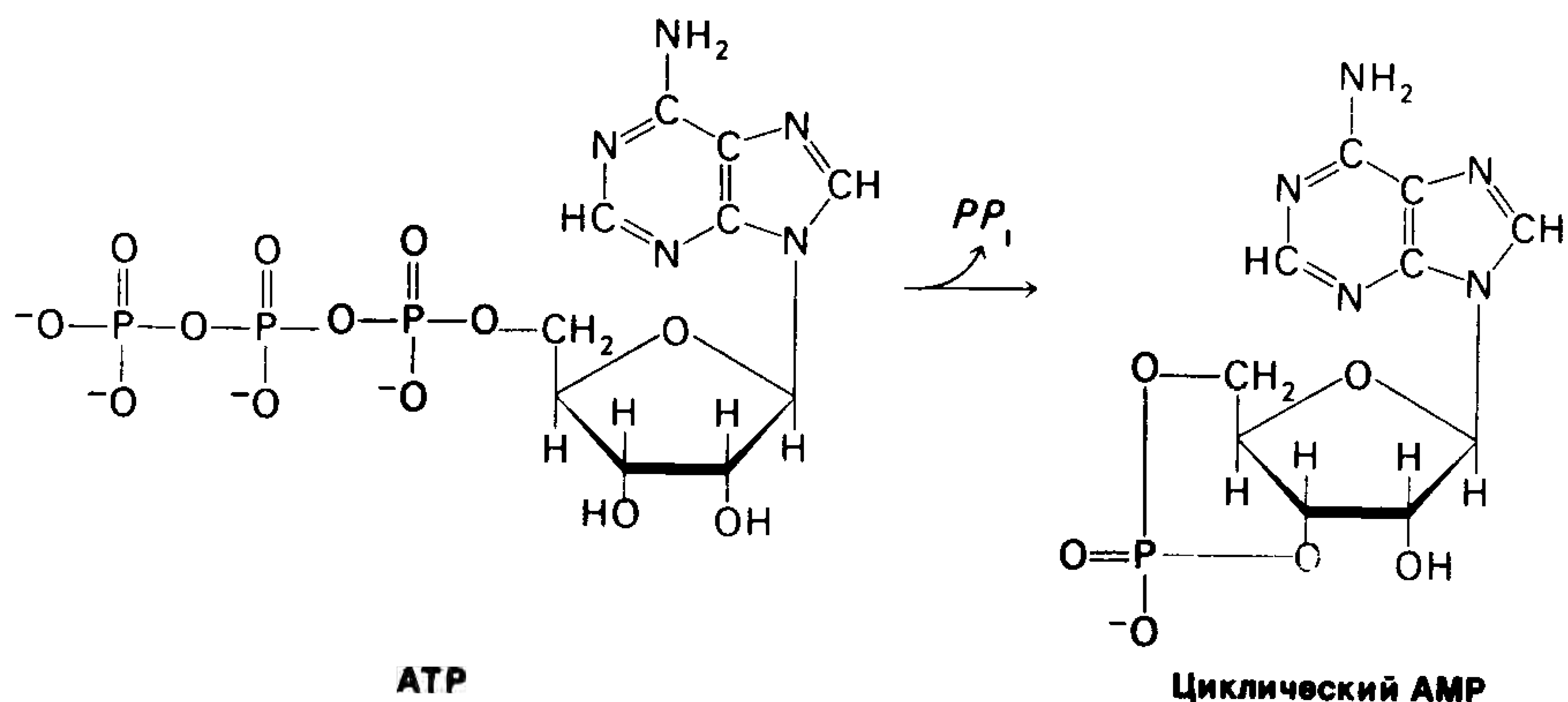
Адреналин

$^{+}H_3N$-His-Ser-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr- 10

-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln- 20

-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COO^- 29

Глюкагон



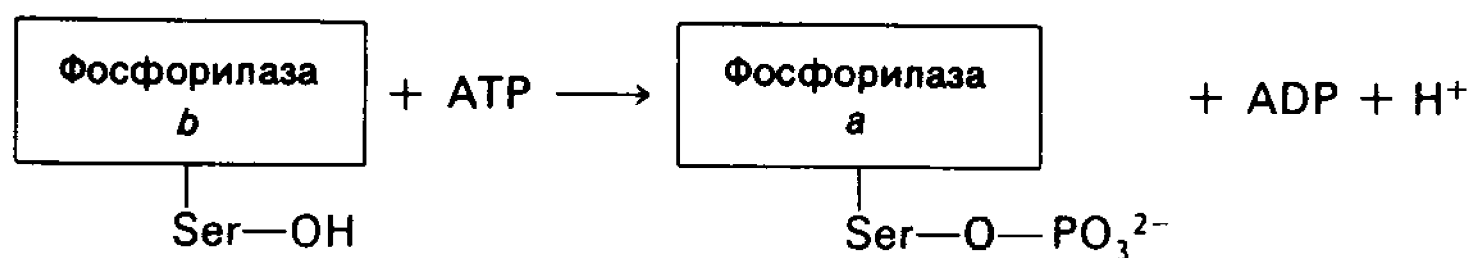
Эрл Сазерланд (Earl Sutherland) установил, что действие адреналина и глюкагона на метаболизм опосредуется *циклическим AMP*. Это открытие привело к представлению об универсальном присутствии циклического AMP во всех формах жизни и о его ключевой роли в регуляции биологических процессов (гл. 35). Синтез этой регуляторной молекулы из ATP катализируется *аденилатциклазой*, ферментом, связанным с плазматическими мембранами. Процесс ускоряется последующим гидролизом пирофосфата.

Адреналин и глюкагон не проникают в свои клетки-мишени. Они связываются с плазматическими мембранами и стимулируют аденилатциклазу (разд. 35.3). Повышенное внутриклеточное содержание циклического AMP запускает ряд реакций, приводящих к активации фосфорилазы и ингибированию гликоген-синтазы. Мы рассмотрим теперь структурную основу регуляции активности указанных ключевых ферментов обмена гликогена и затем перейдем к каскаду реакций, устанавливающих связь между этими ферментами и циклическим AMP.

16.11. Фосфорилаза активируется путем фосфорилирования специфического остатка серина

Фосфорилаза скелетных мышц существует в двух взаимопревращающихся формах: *активная* фосфорилаза *a* и обычно *неактивная* фосфорилаза *b* (рис. 16.5). Фермент представляет собою димер, мол. масса субъединиц которого равна 92 кДал. Фосфорилаза *b* превращается в фосфорилазу *a* путем фосфорилирования одного остатка серина (серина-14) в каждой субъединице. Эта ковалентная модификация катализируется специфическим ферментом *киназой фосфорилазы*, который был открыт Эдмондом Фишером (Edmond Fischer) и Эдвином Кребсом (Edwin Krebs). Фосфорилаза *a* инактивируется специфической фосфатазой, гидролизующей фосфорильную группу, присоединенную к серину-14.

Мышечная фосфорилаза *b* активна только в присутствии высоких концентраций AMP, действующих аллостерически. AMP связывается с центром связывания нуклеотида и изменяет конформацию фосфорилазы *b*. ATP действует как отрицательный аллостерический эффектор, конкурируя с AMP. Глюкозо-6-фосфат также ингибирует фосфорилазу *b* преимущественно путем связывания с другим активным центром. При большинстве физиологических состояний *фосфорилаза b неактивна вследствие ингибирующего действия ATP и глюкозо-6-фосфата*. В противоположность этому *фосфорилаза a полностью активна* независимо от содержания AMP, ATP и глюкозо-6-фосфата. Доля активного фермента определяется прежде всего скоростями фосфорилирования и дефосфорилирования. В неработающей мышце почти весь



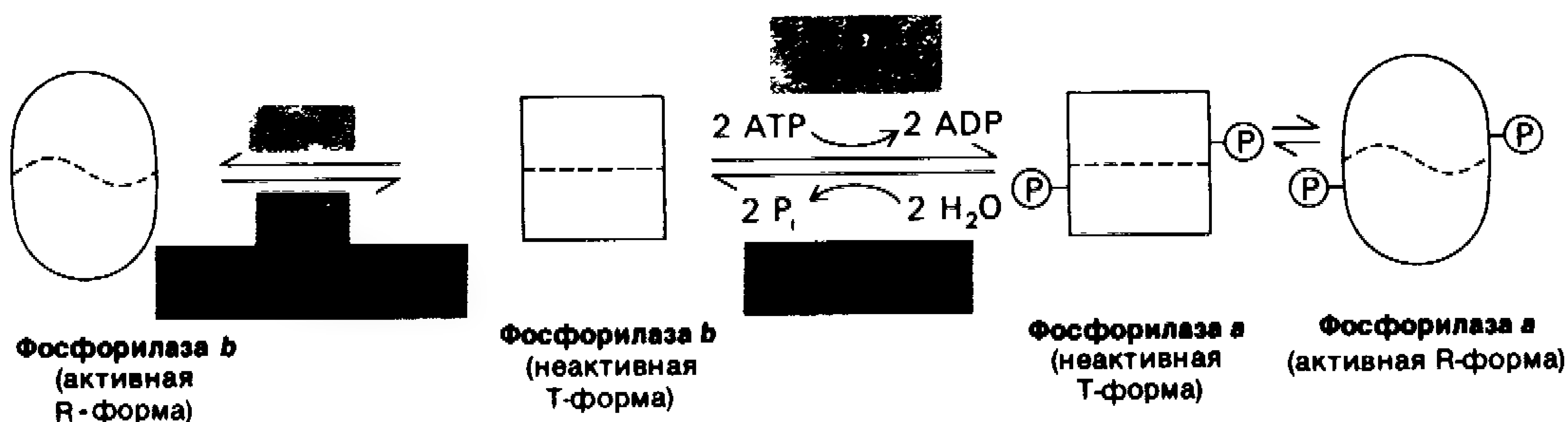


Рис. 16.5. Схематическое изображение регуляции гликоген-фосфорилазы в скелетных мышцах. Фермент может принимать каталитически неактивную T (напряженную) конформацию или активную R (релаксированную) конформацию. Равновесие R⇌T для фосфорилазы *a* сдвинуто далеко в сторону активного R-состояния. В противоположность этому фосфорилаза *b* находится преимущественно в неактивном T-состоянии, исключая случаи, когда содержание AMP находится на высоком уровне, а содержание ATP и глюкозо-6-фосфата – на низком. При большинстве физиологических состояний доля активного фермента определяется скоростями фосфорилирования и дефосфорилирования.

фермент находится в неактивной *b*-форме. Как будет указано в следующем разделе, повышенное содержание адреналина и электростимуляция мышцы приводят к образованию активной *a*-формы.

16.12. Трехмерная структура гликоген-фосфорилазы

Рентгенокристаллографические исследования *a*- и *b*-форм гликоген-фосфорилазы значительно облегчили изучение каталитических и регуляторных механизмов этого ключевого фермента метаболизма. 841 аминокислотный остаток мономерной субъединицы компактно упакованы в три структурных домена (рис. 16.6): *аминоконцевой домен* (310 остатков), *гликоген-связывающий домен* (160 остатков) и *карбоксиконцевой домен* (371 остаток). *Каталитический центр* локализован в глубокой щели, образованной остатками аминокислот каждого из этих трех доменов. Такая защита активного центра от водной среды должна, очевидно, благоприятствовать преобладанию фосфоролиза над гидролизом. *Пиридоксальфосфат (витамин* B_6), который необходим для действия фермента, связывается вблизи участка присоединения глюкозо-1-фосфата. Альдегидная группа этого кофактора образует шиффово основание с лизиновой боковой цепью C-концевого домена. Сохранение ферментативной активности после восстановления шиффова основания боргидридом говорит о том, что в данном случае альдегидная группа в отличие от таковой в случае других пиридоксалевых ферментов не участвует в катализе. В то же время фосфорильная группа пиридоксальфосфата, по-видимому, принимает прямое участие в катализе. В молекуле фосфорилазы имеется также *участок связывания гликогена*, отстоящий от каталитического центра на 30 Å. Этот участок имеет важное значение для присоединения фермента к частице гликогена. Благодаря такому большому расстоянию между местом связывания гликогена и каталитическим центром фермент может осуществлять фосфоролиз многих концевых остатков, не претерпевая диссоциации и реассоциации после каждого каталитического цикла.

Помимо этого фосфорилаза содержит по меньшей мере два аллостерических *участка контроля*. Глюкоза и нуклеозиды, являющиеся аллостерическими ингибиторами печеночной фосфорилазы *a* (разд. 16.18), связываются вблизи каталитического центра. AMP, аллостерический активатор фосфорилазы *b*, связывается рядом с границей между субъединицами, далеко от каталитического центра и участка

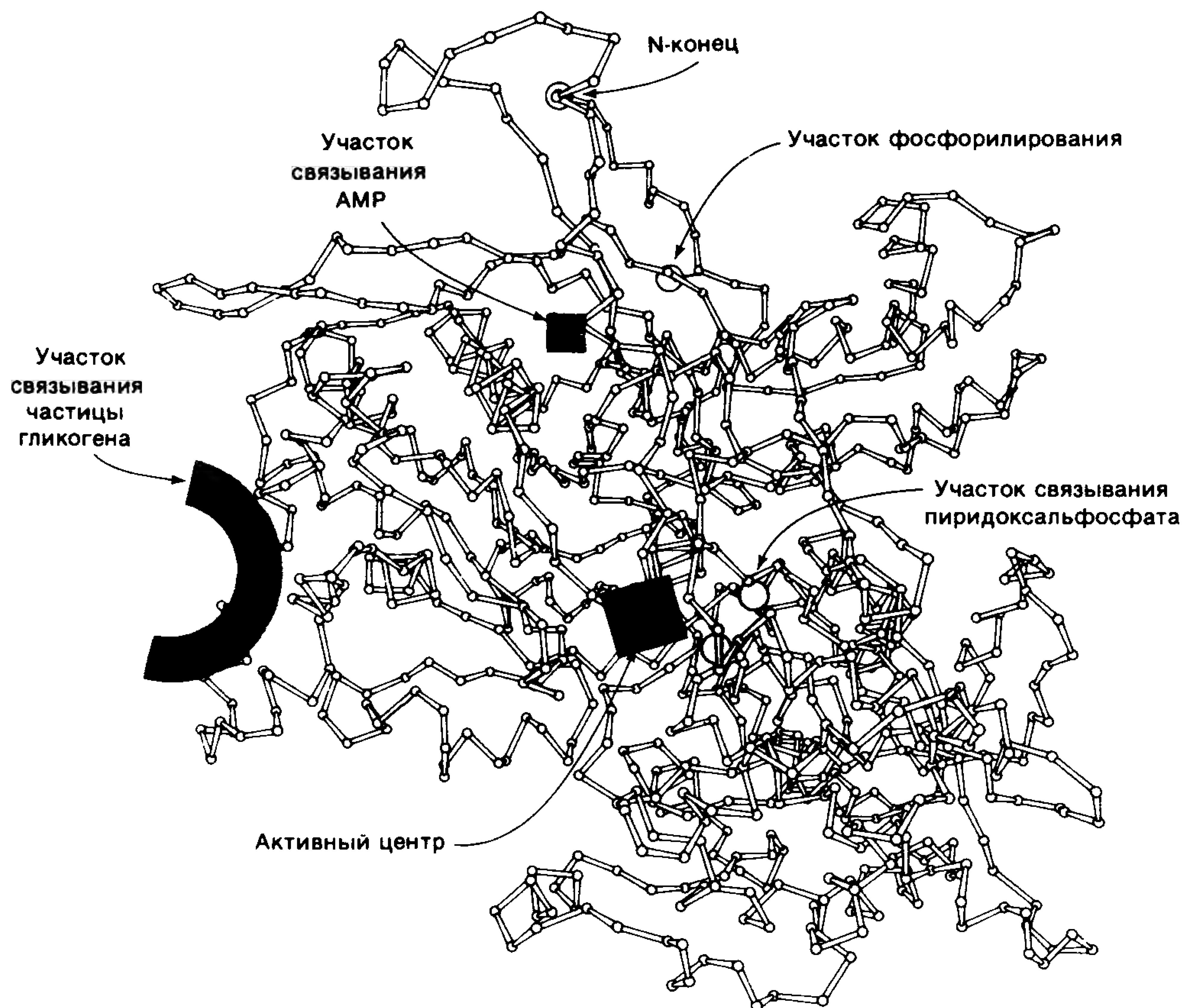
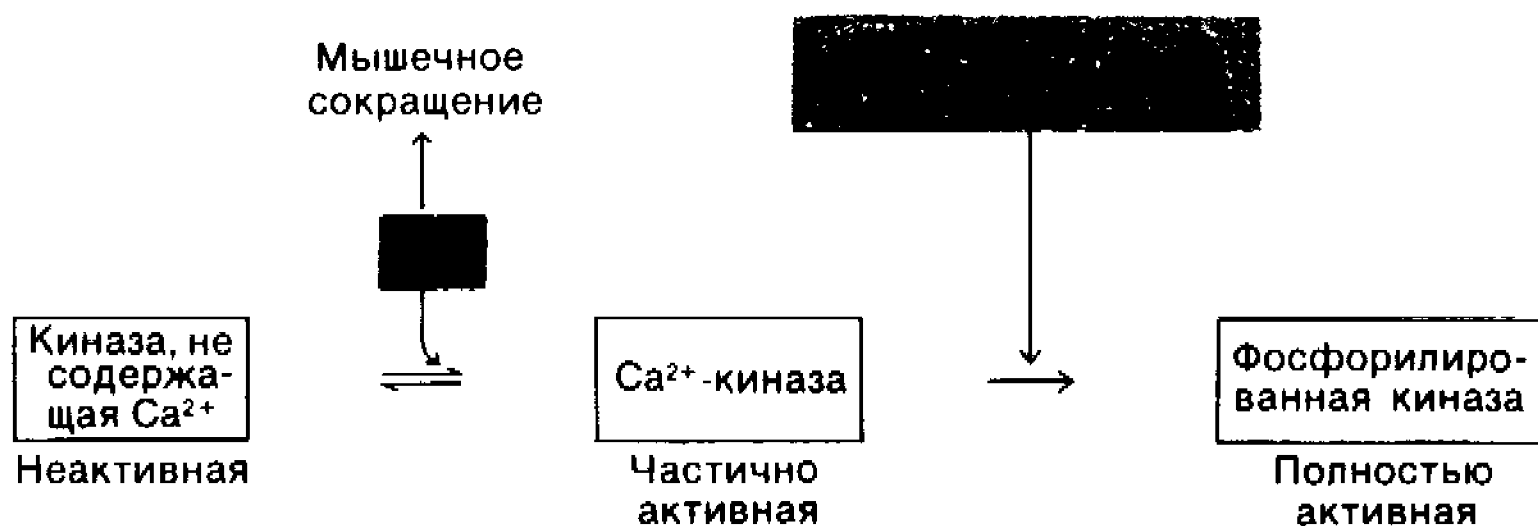


Рис. 16.6. Схематическое изображение α-углеродного остова фосфорилазы *a*. Показана локализация каталитически активного центра, а также участков связывания частицы гликогена, аллостерических центров и участков фосфорилирования. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robert Fletterick, д-ра Neil Madsen, д-ра Peter Kasvinsky.)

связывания гликогена. Серин-14, *место фосфорилирования* при превращении фосфорилазы *b* в фосфорилазу *a*, также локализован вблизи границы между субъединицами. Эта фосфорильная группа в фосфорилазе *a* соединена водородной связью с боковой цепью аргинина-69. В то же время область, охватывающая 19 N-концевых остатков в фосфорилазе *b*, не имеет строго определенной структуры. Эта область *b*-формы напоминает по гибкости очень подвижный активационный домен в трипсиногене, который принимает строго упорядоченную конформацию при превращении в трипсин (разд. 8.11). Детальные исследования структурных изменений, вызываемых фосфорилированием и аллостерическими эффекторами, находятся в процессе развития. Но уже сейчас ясно, что гликоген-фосфорилаза представляет собою утонченный интегратор информации об энергетическом метаболизме клетки.

16.13. Киназа фосфорилазы также активируется путем фосфорилирования

Активность киназы фосфорилазы также регулируется путем ковалентной модификации. Киназа фосфорилазы, подобно фосфорилазе, превращается из *формы с низкой активностью в высокоактивную форму в результате фосфорилирования*. Фермент, катализирующий эту активацию, является компонентом системы гормон—циклический АМР, которую мы рассмотрим несколько позднее. Киназа фосфорилазы мо-



жет быть частично активирована и другим путем, под действием Ca^{2+} в концентрациях порядка 10^{-7} М. Этот механизм активации имеет для биологических процессов важное значение, поскольку мышечное сокращение запускается высвобождением Ca^{2+} (гл. 34). Таким образом, *расщепление гликогена и мышечное сокращение связаны преходящим увеличением содержания Ca^{2+} в цитоплазме.*

16.14. Гликоген-синтаза инактивируется при фосфорилировании специфического серинового остатка

Синтез гликогена тесно координирован с его расщеплением. Активность гликоген-синтазы, подобно активности фосфорилазы, регулируется путем ковалентной модификации. В результате фосфорилирования гликоген-синтаза *a* превращается в обычно неактивную форму *b*. Фосфорилированная *b*-форма (называвшаяся раньше D, или зависимая форма) требует для своей активности больших количеств глюкозо-6-фосфата, тогда как дефосфорилированная *a*-форма (ранее называемая I, или независимая форма) активна и в присутствии, и в отсутствие глюкозо-6-фосфата. Таким образом, *фосфорилирование оказывает противоположно направленное действие на активности гликоген-синтазы и гликоген-фосфорилазы.*

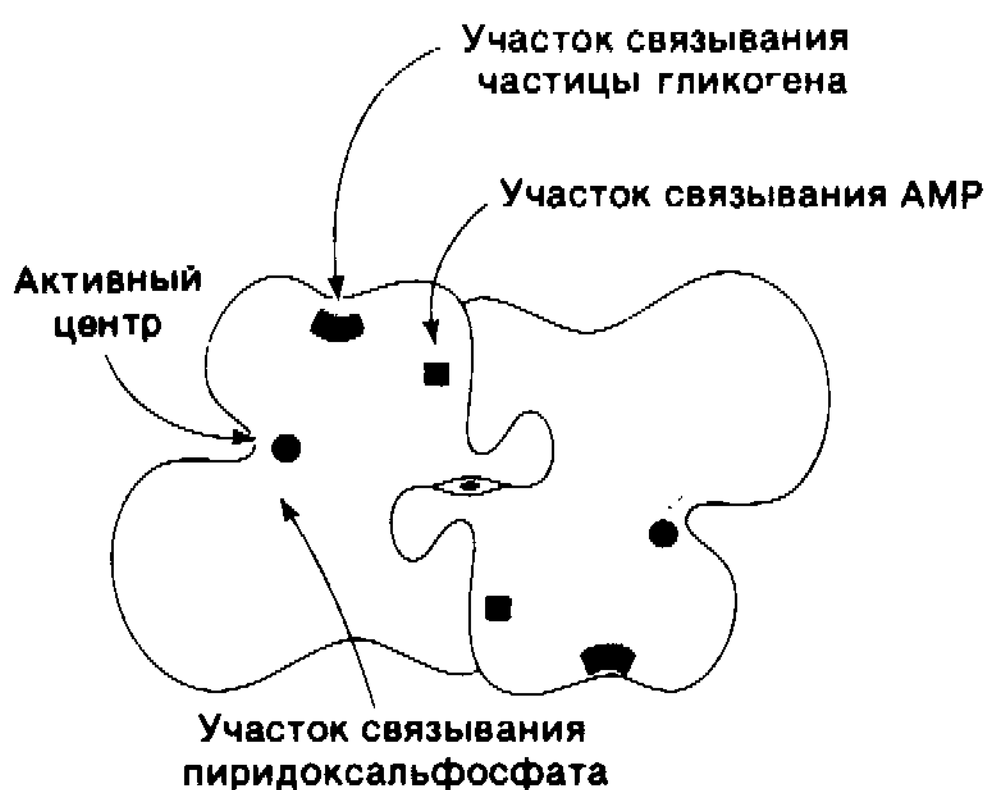


Рис. 16.7. Схематическое изображение димера фосфорилазы *b* по направлению оси симметрии второго порядка, показывающая расположение доменов и связывающих мест. [Weber I. T., Johnson L. N., Wilson K. S., Yeates D. G. R., Wild D. L., Jenkins J. A., Nature, **274**, 433 (1978).]

16.15. Каскад реакций контролирует фосфорилирование гликоген-синтазы и гликоген-фосфорилазы

Рассмотрим теперь связь между гормонами, влияющими на обмен гликогена, и реакциями фосфорилирования, определяющими активности гликоген-синтазы и гликоген-фосфорилазы. При этом происходит следующая последовательность реакций (рис. 16.9):

1. Адреналин связывается с плазматической мембраной мышечной клетки и стимулирует аденилатциклазу.

2. Аденилатциклаза катализирует в плазматической мембране образование циклического AMP из ATP.

3. Повышенное внутриклеточное содержание циклического AMP активирует *протеинкиназу*. В отсутствие циклического AMP эта киназа неактивна, связывание циклического AMP приводит к ее аллостерической стимуляции (гл. 35).

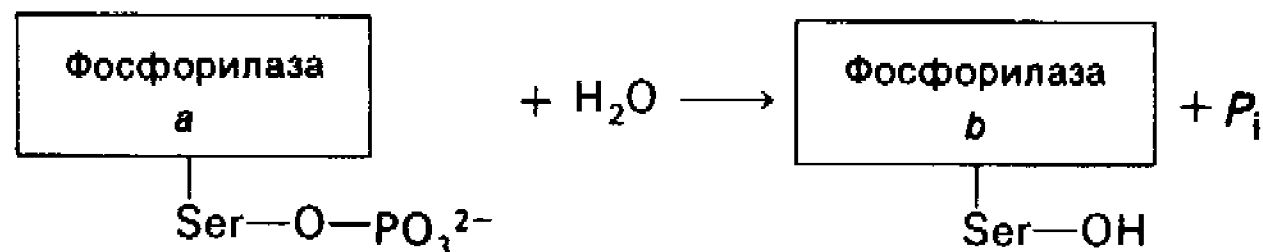
4. Зависимая от циклического AMP протеинкиназа фосфорилирует киназу фосфорилазы и гликоген-синтазу. *Фосфорилирование обоих ферментов лежит в основе координированной регуляции синтеза и расщепления гликогена.* Оно приводит к *«включению» фосфорилазы* (при посредстве киназы фосфорилазы) и к одновременному *«выключению» гликоген-синтазы* (прямым путем).



Рис. 16.8. Электронная микрофотография, на которой показана локализаэия частиц гликогена в сердечной мышце. (Печатается с любезного разрешения д-ра Don W. Fawcett.)

16.16. Фосфатазы вызывают обращение регуляторных эффектов киназ

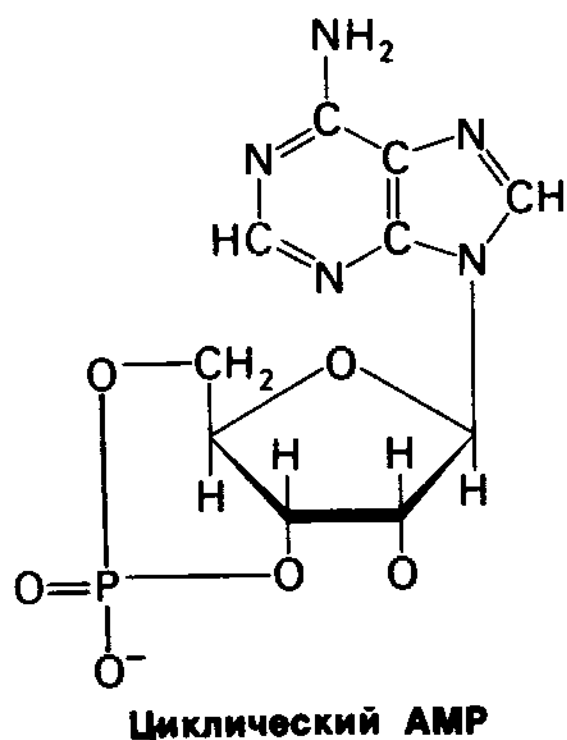
Изменения ферментативной активности, вызываемые фосфорилированием, могут быть обращены путем гидролитического

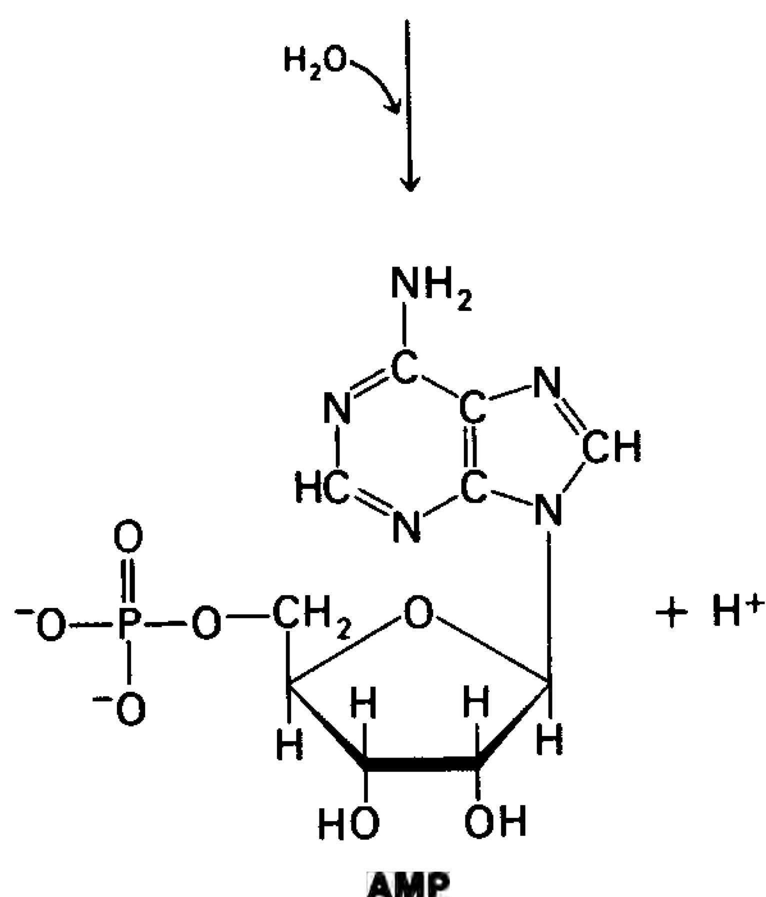


удаления фосфорильной группы. Например, превращение фосфорилазы *a* в фосфорилазу *b* катализируется *фосфатазой фосфорилазы.*

Данный фермент гидролизует также фосфорильную группу активной формы киназы фосфорилазы, вызывая ее инактивацию. Кроме того, эта же фосфатаза удаляет фосфорильную группу из гликоген-синтазы *b*, превращая ее в значительно более активную *a*-форму. Таково еще одно молекулярное устройство, обеспечивающее координированный синтез и расщепление гликогена. Активность фосфатаз также, по-видимому, регулируется. Например, сочетание Ca^{2+} и Mg-ATP ингибирует фосфатазу фосфорилазы, но активирует киназу фосфорилазы. Фосфатаза гликоген-синтазы в мышцах ингибируется гликогеном. Поэтому при высоком содержании гликогена мышечная гликоген-синтаза будет оставаться в фосфорилированной *b*-форме.

Сигнал, возникающий при образовании циклического AMP, также может быть «выключен». Фосфодиэфирная связь в ци-





клическом AMP гидролизуется специфической фосфодиэстеразой с образованием AMP, который не активирует протеинкиназу. Значение $\Delta G^{0\prime}$ этой высокоэкзергонической реакции составляет − 11,9 ккал/моль.

16.17. Каскад реакций амплифицирует гормональный сигнал

Каскад ферментативных реакций в регуляции обмена гликогена аналогичен каскаду протеолитических реакций при свертывании крови (разд. 8.17). В обоих случаях ферментативный каскад создает *высокую степень амплификации.* В случае распада гликогена имеются три ферментативные стадии контроля, тогда как при синтезе гликогена таких стадий две. Если бы имела место прямая регуляция гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы путем связывания адреналина, количество гормона, необходимое для усиления распада гликогена, было бы более чем в тысячу раз выше того количества, которое требуется в присутствии амплифицирующего каскада.

16.18. Обмен гликогена в печени регулирует содержание глюкозы в крови

Контроль синтеза и распада гликогена в печени занимает центральное место в регуляции содержания глюкозы в крови. В норме этот уровень колеблется оттот 80 до 120 мг на 100 мл. Печень чувствительна к концентрации глюкозы в крови: если содержание глюкозы в крови превышает пороговый уровень, печень поглощает глюкозу; если же ее содержание ниже этого уровня, печень высвобождает глюкозу. Количество фосфорилазы *a* в печени быстро уменьшается при вливании глюкозы (рис. 16.10). После лаг-периода возрастает количество гликоген-синтазы *a*, что приводит к синтезу гликогена. Недавно было установлено, что в клетках печени фосфорилаза служит глюкозным датчиком – чувствительным элементом для глюкозы. Связывание глюкозы с фосфорилазой *a* сдвигает аллостерическое равновесие из R-состояния в T-состояние (см. рис. 16.5). В результате *фосфорильная группа при серине-14 становится доступной для гидролиза фосфатазой.* Значительную роль играет при этом то обстоятельство, что фосфатаза, тесно связываясь с фосфорилазой *a*, проявляет свое каталитическое действие только после перехода последней в T-состояние под действием глюкозы.

Каким образом осуществляется активация гликоген-синтазы глюкозой? Напомним, что одна и та же фосфатаза действует на фосфорилазу и на гликоген-синтазу. Фосфорилаза *b* в отличие от *a*-формы не связывает фосфатазу. Следовательно, превращение фосфорилазы *a* в фосфорилазу *b* сопровождается *освобождением фосфатазы, которая теперь может использоваться для активации гликоген-синтазы.* Удаление фосфорильной группы из неактивной синтазы *b* превращает ее в активную *a*-форму. Вначале на одну молекулу фосфатазы приходится около десяти молекул фосфорилазы *a*. Следовательно, повышение активности синтазы может начаться только после перехода большей части фосфорилазы *a* в форму *b* (рис. 16.10). Эта замечательная, чувствительная к глюкозе система зависит от ключевых элементов: 1) связи между аллостерическим центром для глюкозы и серинфосфатом, 2) использования одной и той же фосфатазы для инактивации фосфорилазы и активации гликоген-синтазы и 3) связывания фосфатазы

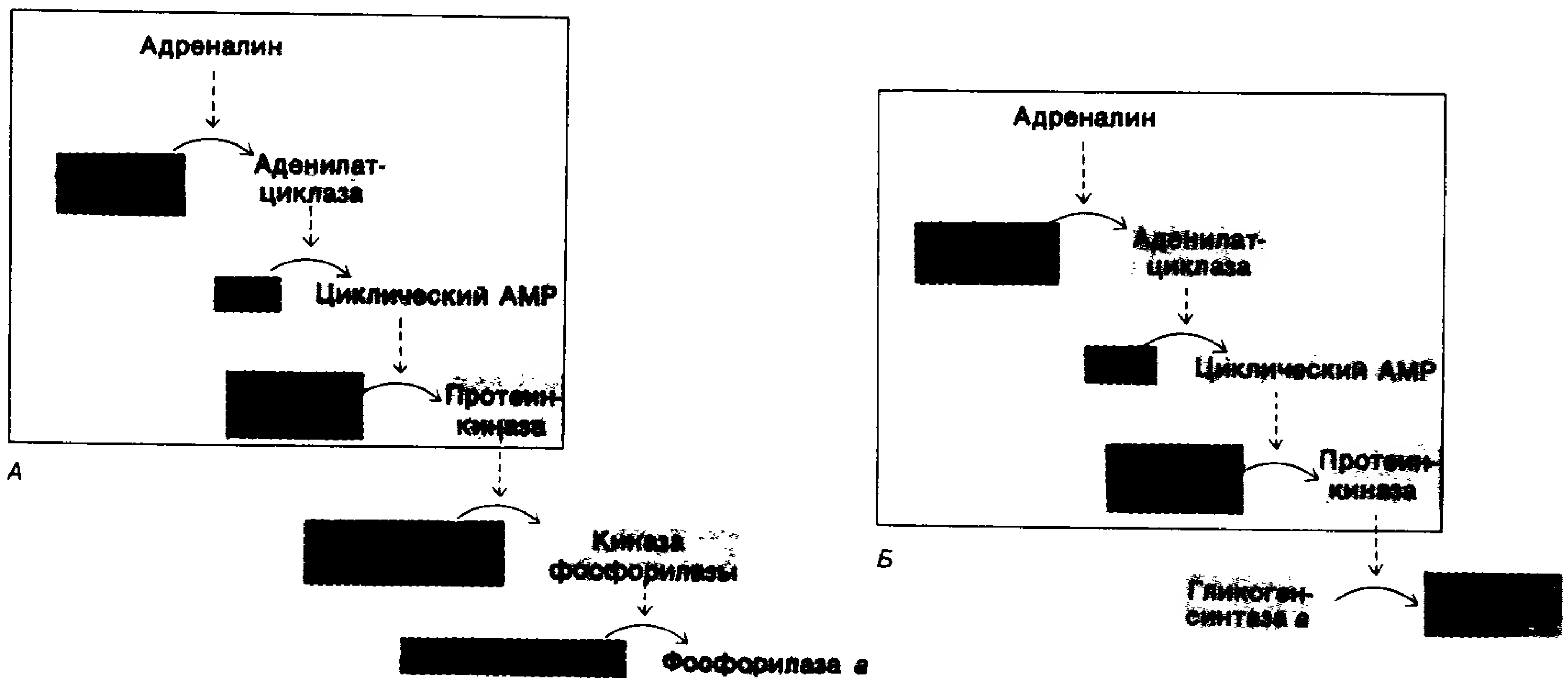


Рис. 16.9. Каскады реакций, регулирующих обмен гликогена: *А* – распад гликогена; *Б* – синтез гликогена. Неактивные формы ферментов показаны красным, активные – зеленым цветом. Последовательность реакций, приводящих к активации протеинкиназы, одна и та же для регуляции распада и для регуляции синтеза гликогена.

с фосфорилазой *a* для предотвращения преждевременной активации гликоген-синтазы.

16.19. Известен ряд генетически детерминированных болезней накопления гликогена

Первая болезнь накопления гликогена была описана Эдгаром фон Гирке (Edgar von Gierke) в 1929 г. У больного был огромный живот вследствие *массивного увеличения печени.* Отмечалась выраженная *гипогликемия* между приемами пищи. Кроме того, после введения адреналина и глюкагона содержание сахара в крови не повышалось. У детей с этим заболеванием могут наблюдаться судороги, связанные с низким содержанием глюкозы в крови.

Природу ферментативного нарушения при болезни Гирке раскрыли Кори в 1952 г. Они установили, что *в печени таких больных отсутствует глюкозо-6-фосфатаза.* Это был впервые обнаруженный случай врожденной недостаточности фермента печени. Гликоген печени у таких больных имел нормальную структуру, но присутствовал в необычно больших количествах. Отсутствие глюкозо-6-фосфатазы в печени вызывает гипогликемию, потому что не происходит образования глюкозы из глюкозо-6-фосфата. Фосфорилированный же сахар не выходит из печени, поскольку он не может пересечь плазматическую мембрану. Происходит компенсаторное усиление гликолиза в печени, обусловливающее повышенное содержание лактата и пирувата в крови. Для людей с болезнью Гирке характерна также повышенная зависимость от жирового обмена.

К настоящему времени уже охарактеризован целый ряд болезней накопления гликогена (табл. 16.1). Кори раскрыли приро-

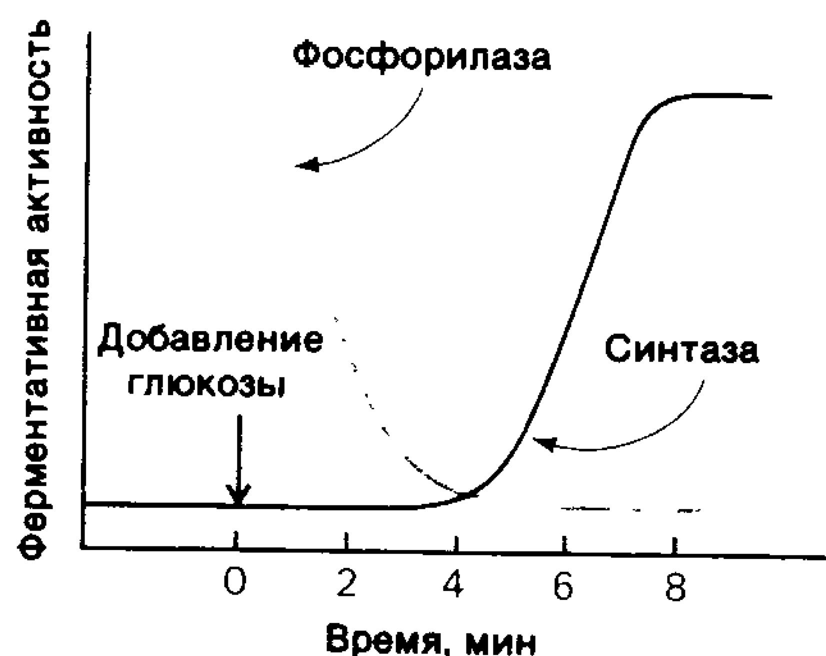


Рис. 16.10. Инфузия глюкозы приводит к инактивации фосфорилазы, которая сопровождается активацией гликоген-синтазы. [Stalmans W., De Wulf H., Hue L., Hers H.G., Eur. J. Biochem., **41**, 127 (1974).]

Таблица 16.1. **Болезни накопления гликогена**

Тип болезни[1]	Дефектный фермент	Пораженный орган	Гликоген в пораженном органе	Клиническая картина
I Болезнь Гирке	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень и почки	Повышенное количество, нормальная структура	Резкое увеличение печени. Недостаточность роста. Тяжелая гипогликемия, кетоз, гиперурикемия, гиперлипемия
II Болезнь Помпе	α-1,4-глюкозидаза (лизосомная)	Все органы	Резкое увеличение количества, нормальная структура	Кардиореспираторная недостаточность, приводящая к смерти, обычно в возрасте до двух лет
III Болезнь Кори	Амило-1,6-глюзидаза (фермент, разрывающий связи в местах ветвления)	Мышцы и печень	Повышенное количество, короткие внешние ветви	Подобна типу I, но с более мягким течением
IV Болезнь Андерсена	Ветвящий фермент (α-1,4 → α-1,6)	Печень и селезенка	Нормальное количество, очень длинные внешние ветви	Прогрессирующий цирроз печени. Недостаточная активность печени вызывает смерть, обычно в возрасте до двух лет
V Болезнь Мак-Ардля	Фосфорилаза	Мышцы	Умеренно увеличенное количество, нормальная структура	Ограниченная способность выполнять интенсивные физические упражнения из-за болезненных мышечных судорог. Других отклонений от нормы нет, развитие хорошее
VI Болезнь Херса	Фосфорилаза	Печень	Повышенное количество	Подобна типу I, но с более мягким течением
VII	Фосфофруктокиназа	Мышцы	Повышенное количество, нормальная структура	Подобна типу V
VIII	Киназа фосфорилазы	Печень	То же	Небольшое увеличение печени. Небольшая гипогликемия

[1] Болезни типов с I по VII наследуются как аутосомные рецессивные признаки. Болезнь типа VIII связана с полом.

ду биохимического дефекта и при другой болезни накопления гликогена (тип III), которую нельзя отдифференцировать от болезни Гирке (тип I) путем одного только медицинского обследования. Болезнь типа III характеризуется аномальной структурой гликогена мышц и печени и значительным увеличением его количества. Самым резким отклонением от нормы является очень маленькая длина внешних ветвей гликогена. *У таких больных отсутствует фермент*, разрывающий связи в местах ветвления, (α-1,6-глюкозидаза), и поэтому у них могут эффективно использоваться только самые удаленные от центра молекулы ветви гликогена. Следовательно, лишь небольшая часть этого аномального гликогена функционально активна в качестве доступной резервной формы глюкозы.

Нарушение обмена только мышечного гликогена имеет место при болезни Мак-Ардля (McArdle) (тип V). В этом случае *в мышцах отсутствует фосфорилазная активность*, и больные обладают ограниченной способностью к выполнению интенсивных физических упражнений из-за болезненных мышечных судорог. Других отклонений от нормы не обнаруживается, больные хорошо развиваются. Таким образом, эффективное использование мышечного гликогена не является жизненно необходимым.

16.20. Крахмал – резервный полисахарид у растений

Мы обратимся теперь к другим распространенным полисахаридам. Резервным полисахаридом у растений является *крахмал*, который существует в двух формах. *Амилоза*, неразветвленный тип крахмала, состоит из глюкозных остатков, соединенных α-1,4-связью. В *амилопектине*, разветвленной форме, на тридцать α-1,4-связей имеется примерно одна α-1,6-связь. Таким образом, он подобен гликогену, отличаясь от последнего более низкой степенью ветвления.

На долю крахмала приходится больше половины потребляемых человеком углеводов. И амилопектин и амилоза быстро гидролизуются *α-амилазой*, которая секретируется слюнными железами и поджелудочной железой. Альфа-амилаза гидролизует внутренние α-1,4-связи, приводя к образованию *мальтозы*, *мальтотриозы* и *α-декстрина*. Мальтоза состоит из двух остатков глюкозы, соединенных между собой α-1,4-связью (рис. 16.12); мальтотриоза состоит из трех таких остатков. Альфа-декстрин образован несколькими остатками глюкозы, соединенными между собой α-1,6-связью в дополнение к α-1,4-связям. Мальтоза и малтотриоза гидролизуются до глюкозы под действием *мальтазы*, тогда как α-декстрин гидролизуется до глюкозы *α-декстриназой*. В солоде присутствует другой вид амилазы, называемый *β-амилазой*; она гидролизует крахмал до мальтозы. Бета-амилаза действует только на остатки невосстанавливающего конца.

Другой главный полисахарид растений – это *целлюлоза*, выполняющая не питательную, а структурную функцию. В действительности *целлюлоза является наиболее распространенным органическим соединением в биосфере*, содержащим более половины всего органического углерода. Она представляет собою неразветвленный полимер из остатков глюкозы, соединенных β-1,4-связями. У млекопитающих нет целлюлаз, и поэтому они не способны переваривать древесину и растительные волокна. Однако в пищеварительном тракте некоторых жвачных обитают бактерии, продуцирующие целлюлазу, благодаря чему эти животные могут переваривать целлюлозу.

Декстран – другой полисахарид, состоящий только из остатков глюкозы, соединенных между собой преимущественно α-1,6-связью. Отдельные ветви в зависимости от вида организма образуются α-1,2-, α-1,3- или α-1,4-связями. Декстран служит резервным полисахаридом у дрожжей и бактерий. Наружный скелет (экзоскелет) насекомых и ракообразных содержит *хитин*, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина при помощи β-1,4-связей. Хитин, таким образом, подобен целлюлозе, с той лишь разницей, что в нем заместителем при С-2 служит ацетилированная аминогруппа, а не гидроксильная группа.



Рис. 16.11. Электронная микрофотография скелетной мышцы ребенка с болезнью накопления гликогена типа II (болезнь Помпе). Лизосомы перегружены гликогеном вследствие недостаточности α-1,4-глюкозидазы. Этот дефект расщепления гликогена ограничен лизосомами. Количество гликогена в цитозоле находится в норме. (Hers H. G., Van Hoof F., Lysosomes and Storage Diseases, Academic Press, 1973, p. 205.)

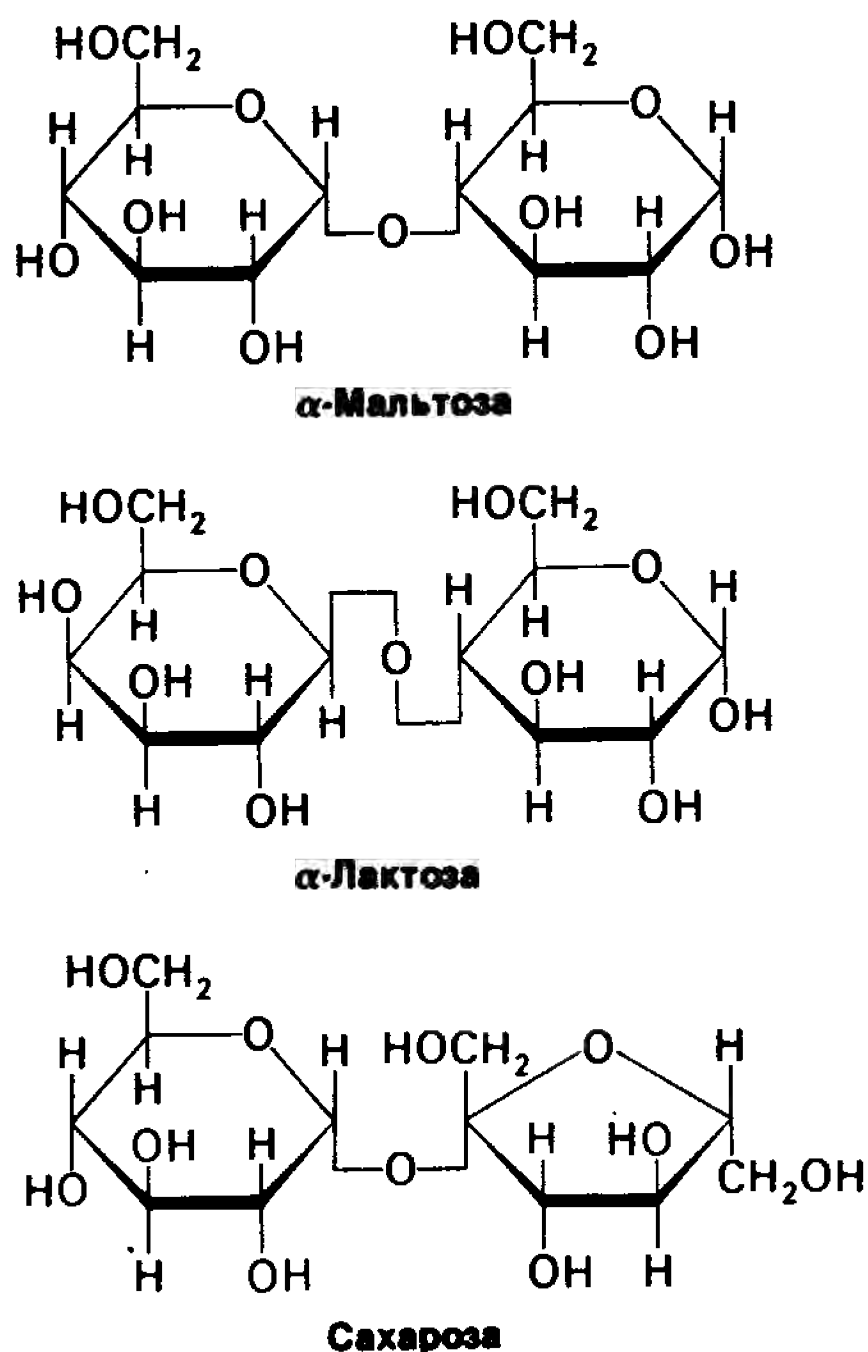


Рис. 16.12. Строение наиболее широко распространенных дисахаридов: α-мальтозы, α-лактозы и сахарозы. Буква α относится к конфигурации аномерного углеродного атома на восстанавливающем конце дисахарида, а не к конфигурации гликозидной связи.

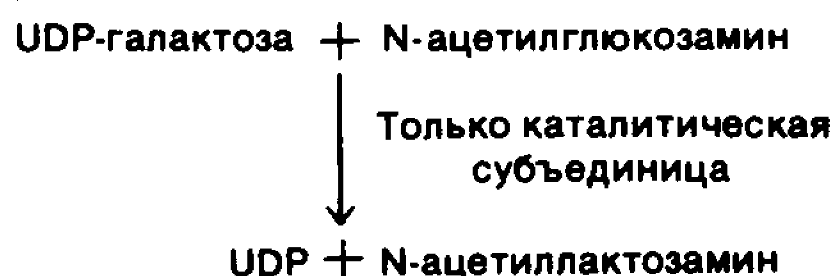
16.21. Мальтоза, сахароза и лактоза – широко распространенные дисахариды

Структура этих трех распространенных дисахаридов показана на рис. 16.12. Как упоминалось выше, *мальтоза* возникает в результате гидролиза крахмала и затем гидролизуется мальтазой до глюкозы. *Сахарозу*, обычный столовый сахар, получают промышленным способом из сахарного тростника или сахарной свеклы. Аномерные углеродные атомы остатков глюкозы и фруктозы связаны в сахарозе α-гликозидной связью. Поэтому в сахарозе в отличие от других сахаров отсутствует восстанавливающая концевая группа. Гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы катализируется *сахаразой*. *Лактоза* представляет собой дисахарид, содержащийся в молоке, и нигде больше в сколько-нибудь заметном количестве не обнаружена. Она гидролизуется *лактазой* с образованием галактозы и глюкозы. Лактаза, сахараза, мальтаза и α-декстриназа связаны с клетками слизистой оболочки тонкого кишечника.

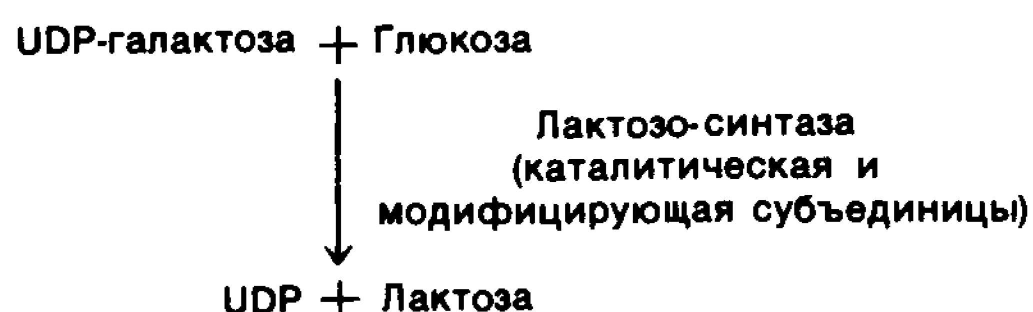
UDP-сахара – активированные промежуточные продукты при синтезе сахарозы и лактозы, так же как UDP-глюкоза служит донором глюкозильного остатка при синтезе гликогена. На самом деле *нуклеозиддифосфатсахара являются активированными промежуточными продуктами почти во всех процессах синтеза гликозидных связей.* Например, целлюлоза в зависимости от вида растений синтезируется из аденозиндифосфоглюкозы (ADP-глюкозы), цитидиндифосфоглюкозы (CDP-глюкозы) или гуанозиндифосфоглюкозы (GDP-глюкозы). *Сахароза* синтезируется путем переноса глюкозы от UDP-глюкозы на фруктозо-6-фосфат с образованием сахарозо-6-фосфата, который затем гидролизуется до сахарозы.

16.22. Синтез лактозы контролируется модифицирующей субъединицей

Регуляция синтеза лактозы представляет особенно большой интерес. Лактозо-синтаза состоит из каталитической и модифицирующей субъединиц. Изолированная каталитическая субъединица, названная *галактозилтрансферазой*, активна в катализе переноса галактозы с UDP-галактозы на N-ацетилглюкозамин с образованием N-ацетиллактозамина.



Специфичность каталитической субъединицы изменяется в результате связывания с *α-лактальбумином*, модифицирующей субъединицей. Образующийся комплекс, называемый *лактозо-синтазой*, переносит галактозу не на N-ацетилглюкозамин, а на глюкозу, что приводит к образованию лактозы.



Галактозилтрансфераза присутствует в большинстве тканей, где она участвует в синтезе углеводного компонента гликопротеинов. В отличие от нее лактозо-синтаза обнаруживается только в молочной железе. Во время беременности галактозилтрансфераза синтезируется и накапливается в молочной железе; модифицирующая субъединица образуется в небольшом количестве. При родах резкие изменения в содержании некоторых гормонов вызывают синтез больших количеств модифицирующей субъединицы. Образующийся в результате этого лактозо-синтазный комплекс синтезирует большие количества лактозы. *Регуляция синтеза лактозы иллюстрирует*, что *гормоны могут оказывать свое физиологическое действие путем резкого изменения специфичности ферментов.*

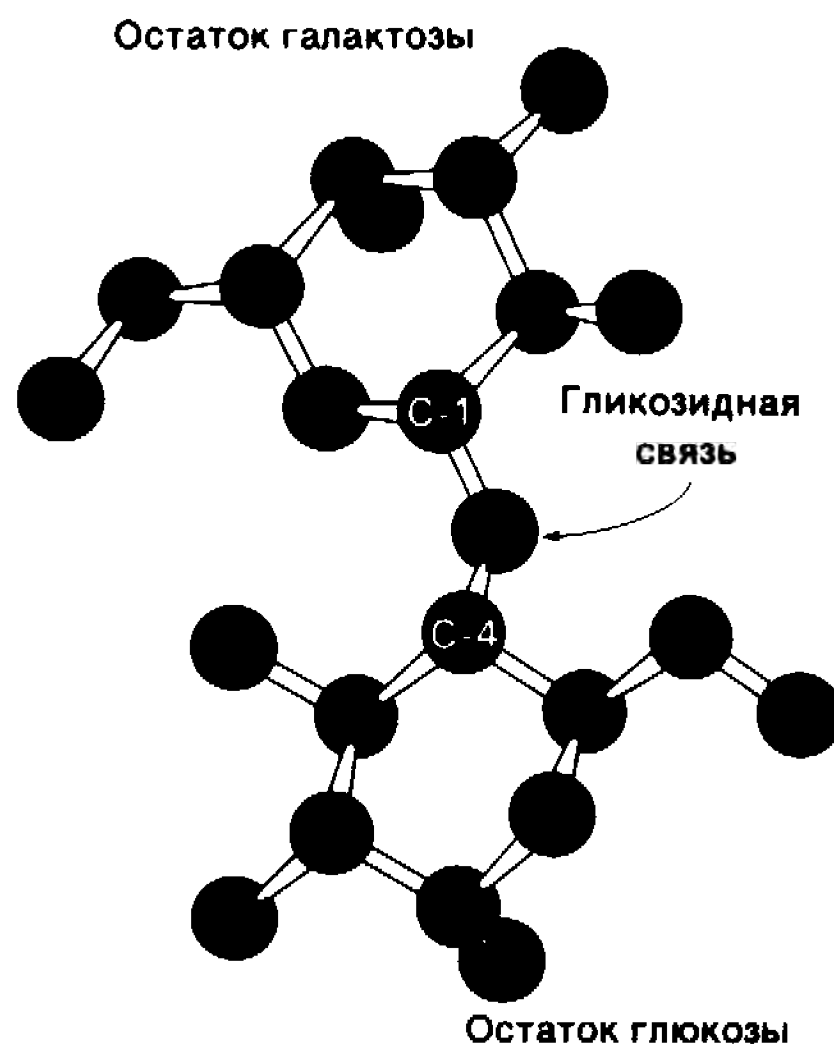


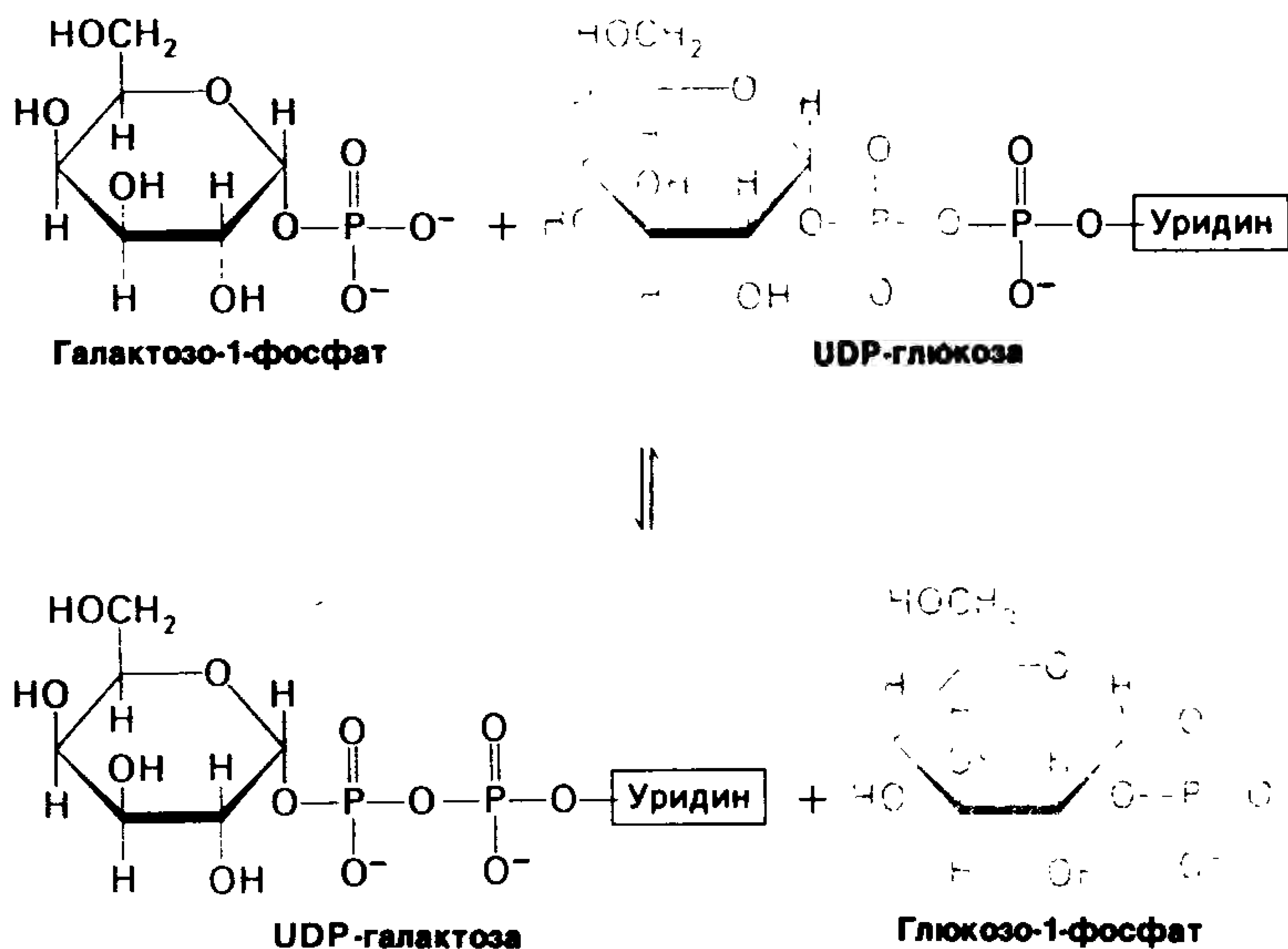
Рис. 16.13. Модель лактозы.

16.23. Интолерантность к молоку у взрослых, обусловленная недостаточностью лактазы

Почти все младенцы и дети способны переваривать лактозу. В отличие от этого у большинства взрослых людей в некоторых популяционных группах имеет место дефицит лактазы, обусловливающий их интолерантность к молоку. У людей с недостаточностью лактазы после приема молока в просвете тонкого кишечника накапливается лактоза, поскольку у них нет механизма, который бы обеспечивал всасывание этого дисахарида. Большой осмотический эффект невсосавшейся лактозы вызывает приток жидкости в тонкий кишечник. Поэтому клиническими симптомами интолерантности к лактозе являются вздутие живота, тошнота, судороги, боль и водная диаррея. Недостаточность лактазы, по-видимому, наследуется как аутосомный рецессивный признак и обычно проявляется у подростков или у молодых людей. Распространенность недостаточности лактазы в популяциях людей широко варьирует. Так, она встречается у 3% датчан и 97% таитян. Популяции людей, не потребляющих во вро слом состоянии молока, обычно характеризуются высокой частотой возникновения недостаточности лактазы. Это в равной мере относится и к другим млекопитающим. Способность организма взрослого человека переваривать лактозу, по-видимому, развилась около десяти тысяч лет назад в связи с одомашниванием крупного рогатого скота.

16.24. Вступление фруктозы и галактозы на путь гликолиза

На долю фруктозы приходится значительная часть поступающих с пищей углеводов. Обычное ее дневное потребление составляет 100 г – как в виде свободного сахара, так и в качестве компонента сахарозы. Большая часть потребляемой фруктозы метаболизируется печенью по *фруктозо-1-фосфатному пути.* Первым этапом на этом пути является фосфорилирование фруктозы во фруктозо-1-фосфат под действием фруктокиназы. Фруктозо-1-фосфат далее расщепляется на глицеральдегид и дигидроксиацетонфосфат. Это альдольное расщепление катализируется специфической фруктозо-1-фосфат – альдолазой. Глицеральдегид затем фосфорилируется триозокиназой в глицеральдегид-3-фосфат и, таким образом, может также включиться в гликолитический процесс. Существует и другая *возможность*: *фруктоза может подвергнуться фосфорилированию во фруктозо-6-фосфат под действием гексокиназы.* Однако сродство гексокиназы к глюкозе в двадцать раз больше, чем к фруктозе, и поэтому в печени, характеризующейся высоким содержанием глюкозы, имеет ме-

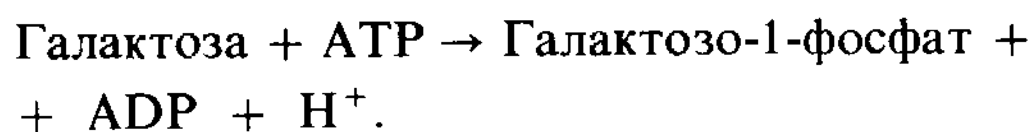


сто лишь незначительное фосфорилирование фруктозы во фруктозо-6-фосфат. В то же время в жировой ткани, где содержание фруктозы значительно выше, чем содержание глюкозы, образование фруктозо-6-фосфата не подвергается сколько-нибудь существенному конкурентному ингибированию. Поэтому в жировой ткани большая часть фруктозы метаболизируется через фруктозо-6-фосфат.

гидроксильной группы при С-4 инвертируется *UDP-галактозо-4-эпимеразой*, содержащей прочносвязанный NAD^+. Опыты с флуоресцентной меткой показали, что этот NAD^+ во время катализа подвергается преходящему восстановлению в NADH. NAD^+, возможно, акцептирует атом водорода, присоединенный к С-4 сахара, и в результате образуется 4-кетосахар в качестве промежуточного продукта. Затем водород



Галактоза образуется в результате гидролиза лактозы, основного углевода молока. Галактоза превращается затем в глюкозо-1-фосфат в четыре стадии. Первая реакция на пути *взаимопревращения галактоза — глюкоза* — это фосфорилирование галактозы в галактозо-1-фосфат под действием галактокиназы.



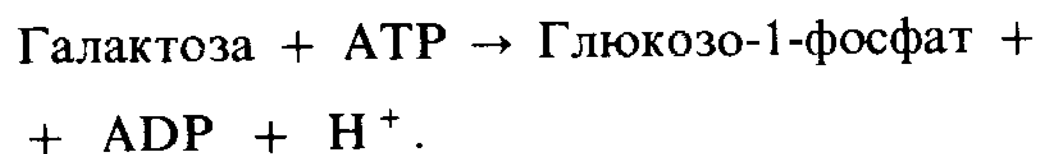
Галактоза + ATP → Галактозо-1-фосфат + + ADP + H^+.

Затем в ходе обменной реакции, катализируемой *галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазой*, образуется UDP-галактоза.

Галактоза, присоединенная к UDP, далее эпимеризуется в глюкозу. Конфигурация

NADH переносится на другую сторону С-4 с образованием еще одного эпимера.

Суммарная реакция отдельных этапов, катализируемых галактокиназой, трансферазой и эпимеразой, имеет следующий вид:



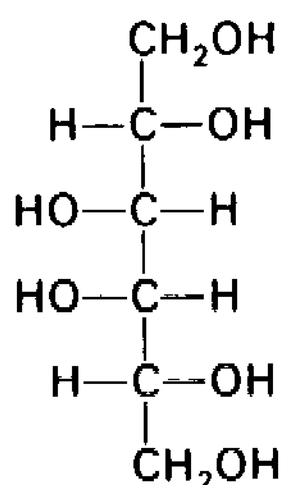
Галактоза + ATP → Глюкозо-1-фосфат + + ADP + H^+.

Обратимая реакция, катализируемая эпимеразой, имеет важное значение не только для утилизации галактозы в качестве топливной молекулы. *Превращение UDP-глюкозы в UDP-галактозу необходимо для синтеза галактозильных остатков в сложных полисахаридах и гликопротеинах, когда количество галактозы, поступающей с пищей, недостаточно для удовлетворения потребности в этих компонентах.*

16.25. При отсутствии трансферазы галактоза высокотоксична

Отсутствие галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы вызывает *галактоземию*, тяжелую болезнь, которая наследуется как аутосомный рецессивный признак. Метаболизм галактозы у лиц с этим заболеванием блокируется на стадии галактозо-1-фосфата. Больные дети плохо растут. Прием молока вызывает рвоту или понос. Характерные симптомы этой патологии - увеличение печени и желтуха. Во многих случаях больные галактоземией отстают в умственном развитии. Содержание галактозы в крови значительно повышено, и при этом галактоза обнаруживается в моче. Кроме того, увеличивается концентрация галактозо-1-фосфата в эритроцитах. Определяющим диагностическим критерием служит отсутствие в эритроцитах галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы.

Галактоземия излечивается исключением галактозы из рациона. Назначение диеты, лишенной галактозы, приводит к резкому исчезновению практически всех клинических симптомов, кроме отставания в умственном развитии, которое может быть необратимым. Продолжительное потребление галактозы может в некоторых случаях вызвать смерть больного. *Поражения, наблюдаемые при галактоземии, обусловливаются накоплением токсических веществ, а не отсутствием какого-либо необходимого для организма соединения.* Больные способны синтезировать UDP-галактозу из UDP-глюкозы, поскольку эпимеразная активность сохраняется у них в пределах нормы. Одним из токсических веществ является *галактитол*, образующийся при восстановлении галактозы. Высокая концентрация галактитола приводит к образованию катаракты. Галактозо-1-фосфат может быть предшественником некоторых других токсических агентов, а в больших количествах и сам оказывает токсическое действие.



Галактитол

Заключение

Гликоген, легкомобилизуемая форма топливного резерва, представляет собою разветвленный полимер, состоящий из остатков глюкозы. Большинство глюкозных компонентов в гликогене связаны между собою α-1,4-гликозидными связями. Примерно при каждом десятом остатке имеется ветвь, обусловленная наличием α-1,6-гликозидной связи. Гликоген в больших количествах присутствует в мышцах и в печени, где он хранится в цитоплазме в форме гидратированных гранул. Большинство молекул гликогена распадаются до глюкозо-1-фосфата под действием фосфорилазы. Гликозидная связь между С-1 концевого остатка и С-4 соседнего остатка расщепляется ортофосфатом с образованием глюкозо-1-фосфата, который может обратимо превращаться в глюкозо-6-фосфат. Точки ветвления разрушаются при согласованном действии двух других ферментов - трансферазы и α-1,6-глюкозидазы. Последний фермент (известный также как фермент, разрывающий связи в местах ветвления) катализирует гидролиз α-1,6-связей, приводящий к образованию свободной глюкозы. Синтез гликогена идет иным путем. UDP-глюкоза, активированный промежуточный продукт в синтезе гликогена, образуется из глюкозо-1-фосфата и UTP. Гликоген-синтаза катализирует перенос глюкозы от UDP-глюкозы к С-4 гидроксильной группы концевого остатка в растущей молекуле гликогена. Ветвящий фермент превращает некоторые из α-1,4-связей в α-1,6-связи.

Синтез и расщепление гликогена находятся под координированным контролем амплифицирующего каскада реакций. Гликоген-синтаза неактивна, когда активна фосфорилаза, и наоборот. Адреналин и глюкагон стимулируют распад гликогена и ингибируют его синтез путем повышения внутриклеточного содержания циклического AMP, который активирует протеинкиназу. Далее происходит фосфорилирование гликоген-синтазы, приводящее к ее инактивации. Фосфорилаза также подвергается фосфорилированию, но в этом случае фермент превращается в более активную форму. Фосфорильные группы обоих ферментов могут быть удалены при действии одной и той же фосфатазы. Гликоген-син-

таза и гликоген-фосфорилаза регулируются также нековалентными аллостерическими взаимодействиями. Фосфорилаза действительно представляет собою ключевой компонент системы печеночных клеток, чувствительной к содержанию глюкозы.

Пищевым резервом у растений служит крахмал, который подобен гликогену, отличаясь от него только меньшей степенью ветвления. Крахмал гидролизуется до мальтозы, состоящей из двух глюкозных остатков, соединенных между собой α-1,4-связью. Мальтоза в свою очередь гидролизуется до глюкозы. Другие распространённые дисахариды представлены сахарозой, которая гидролизуется на глюкозу и фруктозу, и лактозой, гидролизующейся на галактозу и глюкозу. Галактоза и глюкоза, связанные с UDP, могут подвергаться взаимопревращению. UDP-галактоза является активированным промежуточным продуктом в синтезе лактозы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Cori C.F., Cori G.T., 1947. Polysaccharide phosphorylase. In: Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1942-1962), pp. 186–206, American Elsevier (1964).

Leloir L.F., 1971. Two decades of research on the biosynthesis of saccharides, Science, **172**. 1299–1302.

Kretchmer N., 1972. Lactose and lactase, Sci. Amer., **227(4)**, 70–78. (Интересный анализ популяционной генетики недостаточности лактазы.)

Обзоры и книги

Hers H.G., 1976. The control of glycogen metabolism in the liver, Ann. Rev. Biochem., **45**, 167–190.

Fletterick R.J., Madsen N.B., 1980. The structures and related functions of phosphorylase a. Ann. Rev. Biochem., **49**, 31–61.

Krebs E.G., Preiss J., 1975. Regulatory mechanisms in glycogen metabolism. In: Whelan W.J. (ed.), Biochemistry of Carbohydrates, pp. 337–389, Butterworths.

Dickens F., Randle P.J., Whelan W.J. (eds.), 1968. Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, vols, 1 and 2, Academic Press. (Ценный сборник обзорных статей. Том 1 содержит обзоры по обмену гликогена в печени и мышцах. В томе 2 публикуются обзоры по болезням накопления гликогена и другим нарушениям обмена гликогена.)

Newsholme E.A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism, Academic Press. (В гл. 4 рассматривается регуляция обмена гликогена.) [Имеется перевод: Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма.– М.: «Мир», 1977.]

Stalmans W., Hers H.G., 1973. Glycogen synthesis from UDPG. In: Boyer P.D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 9, pp. 310–361, Academic Press.

Структура фосфорилазы

Madsen N.B., Kasvinsky P.J., Fletterick R.J., 1978. Allosteric transitions of phosphorylase *a* and the regulation of glycogen metabolism, J. Biol. Chem., **253**, 9097–9101. (Предполагаемый механизм регуляции глюкозой обмена гликогена, основанный на рентгенокристаллографических исследованиях аллостерических переходов.)

Weber I.T., Johnson L.N., Wilson K.S., Yeates D.G.R., Wild D.L., Jenkins J.A., 1978. Crystallographic studies on the activity of glycogen phosphorylase *b*, Nature, **274**, 433–437.

Наследственные болезни

Howell R.R., 1978. The glycogen storage diseases. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 137–159, McGraw-Hill.

Segal S., 1978. Disorders of galactose metabolism. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.E. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 160–181.

Вопросы и задачи

1. Напишите уравнение равновесного состояния для образования гликогена из галактозы.
2. Напишите уравнение равновесного состояния для образования глюкозы из фруктозы в печени.
3. Пробу гликогена от пациента с заболеванием печени инкубируют с ортофосфатом, фосфорилазой, трансферазой и ферментом, разрывающим связи в местах ветвления. Соотношение образующихся глюкозо-1-фосфата и глюкозы в этой смеси равно 100. Недостаточность какого фермента наиболее вероятна для этого больного?
4. Чем вы можете объяснить тот факт, что при болезни накопления гликогена типа I (болезни Гирке) количество гликогена увеличивается?

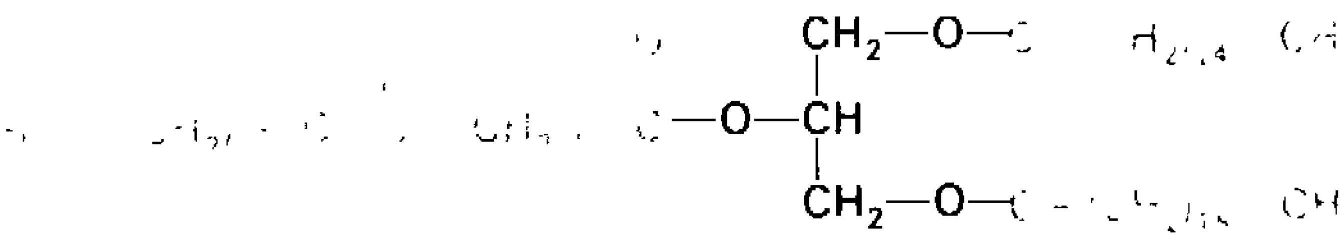
5. Кристаллы фосфорилазы *a*, растущие в присутствии глюкозы, разрушаются при добавлении такого субстрата, как глюкозо-1-фосфат. Почему?

6. Мышечная киназа фосфорилазы – очень большой фермент (1300 кДа) с субъединичной структурой $A_4B_4C_8$. Фосфорилирование B-субъединиц этого фермента зависимой от циклического AMP киназой происходит быстро и приводит к его активации. A-субъединицы фермента фосфорилируются далее с низкой скоростью; при этом и A- и B-субъединицы становятся чувствительными к действию специфической фосфатазы. Каково вероятное функциональное значение медленного фосфорилирования A-субъединиц?

ГЛАВА 17

Обмен жирных кислот

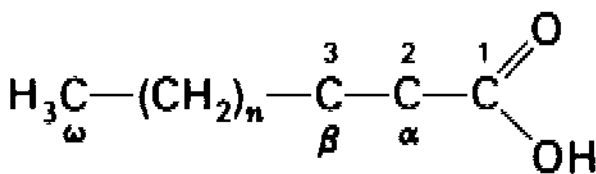
Мы перейдем теперь от метаболизма углеводов к метаболизму жирных кислот, класса соединений, содержащих длинную углеводородную цепь и концевую карбоксильную группу. Жирные кислоты играют две важные физиологические роли. Во-первых, *они служат строительными блоками фосфолипидов и гликолипидов.* Эти амфипатические молекулы представляют собою важные компоненты биологических мембран (гл. 10). Во-вторых, *жирные кислоты являются молекулами, выполняющими роль топлива.* Они запасаются в виде *триацилглицеролов*, не несущих заряда эфиров глицерола. Триацилглицеролы называют также нейтральными жирами, или триглицеридами.



Триацилглицерол

17.1. Номенклатура жирных кислот

Прежде чем перейти к обмену жирных кислот, остановимся вкратце на их номенклатуре. Систематическое название жирной кислоты происходит от названия исходного углеводорода путем присоединения окончания *овая*. Например, насыщенная C_{18}-жирная кислота называется октадека*новой* кислотой, потому что исходным углеводородом является октадекан. C_{18}-жирная кислота с одной двойной связью носит название октадек*еновой* кислоты, с двумя двойными связями – октаде*кадиеновой* кислоты и с тремя двойными связями – октадекат*риеновой* кислоты. Символ 18 : 0 обозначает жирную C_{18}-кислоту без двойных связей, тогда как символ 18 : 2 указывает на наличие в C_{18}-кислоте двух двойных связей. Нумерация углеродных атомов жирной кислоты начинается с карбоксильного конца.



Углеродные атомы 2 и 3 часто обозначаются соответственно как α и β. Углеродный атом метильной группы на дальнем (дистальном) конце цепи назван ω-углеродом. Положение двойной связи представлено знаком Δ с номером в верхнем индексе. Например, обозначение *цис*-Δ^9 говорит о наличии *цис*-двойной связи между 9-м и 10-м углеродными атомами; *транс*-Δ^2 обозначает *транс*-двойную связь между атомами углерода 2 и 3. Жирные кислоты ионизированы при физиологическом значении pH, и поэтому более правильно употреблять название их карбоксилатной формы: например, пальмитат или гексадеканоат.

17.2. Жирные кислоты варьируют по длине цепи и по степени ненасыщенности

Жирные кислоты в биологических системах (табл. 17.1) содержат обычно четное число атомов углерода, как правило от 14 до 24. Наиболее широко распространены

Таблица 17.1. **Некоторые природные жирные кислоты у животных**

Число атомов углерода	Число двойных связей	Тривиальное название	Систематическое название	Формула
12	0	Лаурат	н-Додеканоат	$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$
14	0	Миристат	н-Тетрадеканоат	$CH_3(CH_2)_{12}COO^-$
16	0	Пальмитат	н-Гексадеканоат	$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$
18	0	Стеарат	н-Октадеканоат	$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$
20	0	Арахидат	н-Эйкозаноат	$CH_3(CH_2)_{18}COO^-$
22	0	Бехенат	н-Докозаноат	$CH_3(CH_2)_{20}COO^-$
24	0	Лигноцерат	н-Тетракозаноат	$CH_3(CH_2)_{22}COO^-$
16	1	Пальмитолеат	*цис*-Δ^9-Гексадеценоат	$CH_3(CH_2)_5CH{=}$ $=CH(CH_2)_7COO^-$
18	1	Олеат	*цис*-Δ^9-Октадеценоат	$CH_3(CH_2)_7CH{=}$ $=CH(CH_2)_7COO^-$
18	2	Линолеат	*цис,цис*-Δ^9,Δ^{12}-Октадекадиеноат	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}$ $=CHCH_2)_2(CH_2)_6COO$
18	3	Линоленат	Полностью *цис*-$\Delta^9,\Delta^{12},\Delta^{15}$-октадекатриеноат	$CH_3(CH_2)(CH{=}CHCH_2)_3-$ $(CH_2)_6COO^-$
20	4	Арахидонат	Полностью *цис*-$\Delta^5,\Delta^8,\Delta^{11},\Delta^{14}$-эйкозатетраеноат	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}$ $-CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$

жирные кислоты, содержащие 16–18 атомов углерода. В жирных кислотах животных тканей углеводородная цепь почти всегда не разветвлена. Алкильная цепь может быть насыщенной или содержать одну или более двойных связей. В большинстве ненасыщенных жирных кислот двойная связь имеет *цис*-конфигурацию. В полиеновых (полиненасыщенных) жирных кислотах двойные связи разделены по меньшей мере одной метиленовой группой.

Свойства жирных кислот и липидов, в состав которых они входят, в большой мере зависят от длины цепи жирных кислот и степени их ненасыщенности. Ненасыщенные жирные кислоты имеют более низкую температуру плавления, чем насыщенные кислоты с той же длиной цепи. Например, точка плавления стеариновой кислоты 69,6°C, а олеиновой (содержащей одну *цис*-двойную связь) 13,4°C. Точки плавления полиеновых жирных кислот серии C_{18} еще ниже. Длина цепи также оказывает влияние на точку плавления. Так, в частности, температура плавления пальмитиновой кислоты (C_{16}) на 6,5°C ниже, чем температура плавления стеариновой кислоты (C_{18}). *Таким образом, малая длина цепи и наличие ненасыщенных связей повышают текучесть жирных кислот и их производных*. Значение текучести мембран уже обсуждалось ранее (гл. 10).

17.3. Триацилглицеролы (триглицериды) – высококонцентрированные резервы энергии

Триацилглицеролы (триглицериды) в силу своего *восстановленного* и *обезвоженного* состояния представляют собою высококонцентрированные резервы метаболической энергии. Выход энергии в результате полного окисления жирных кислот составляет около 9 ккал/г, тогда как для углеводов и белков эта величина равна примерно 4 ккал/г. Такое большое различие в выходе энергии объясняется тем, что жирные кислоты являются значительно более высоковосстановленными соединениями. Кроме того, триацилглицеролы обладают сильно выраженной неполярностью и поэтому резервируются в почти обезвоженной форме, тогда как белки и углеводы значительно более полярны и соответственно более высокогидратированы. Действительно, один грамм сухого гликогена связывает около

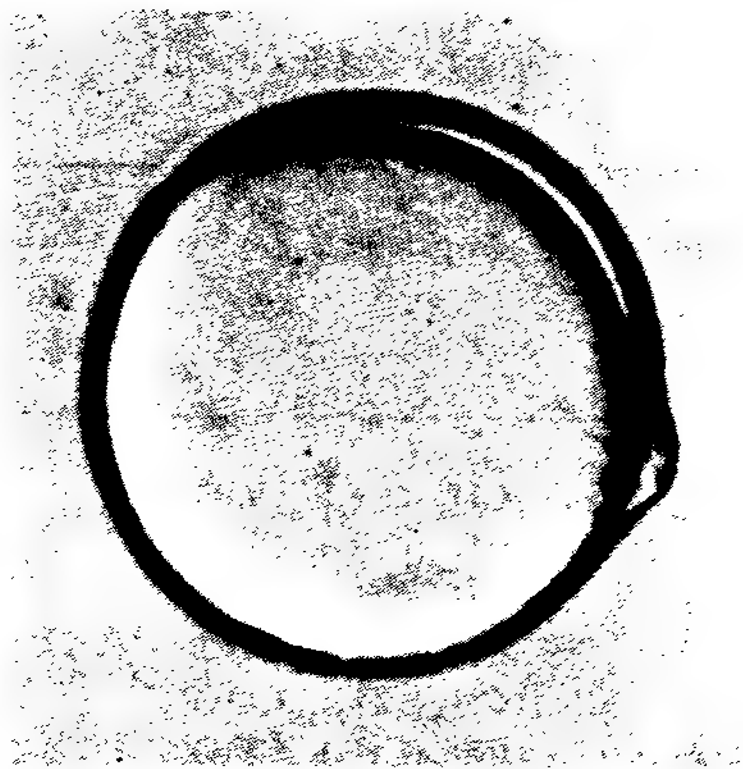


Рис. 17.1. Микрофотография жировой клетки. Большая жировая глобула окружена тонким ободком цитоплазмы и выпуклым ядром. (Печатается с любезного разрешения д-ра Pedro Cuatrecasas.)

двух граммов воды. *Следовательно, количество энергии, запасенной в одном грамме почти обезвоженного жира, более чем в 6 раз превышает количество энергии, запасенной в одном грамме гидратированного гликогена.* Этим и объясняется тот факт, что именно триацилглицеролы, а не гликоген были отобраны в ходе эволюции в качестве основного источника энергии. У человека весом в 70 кг резервы топлива в норме распределяются следующим образом: 100 000 ккал в триацилглицеролах, 25 000 ккал в белках (преимущественно в мышечных), 600 ккал в гликогене и 40 ккал в глюкозе. На триацилглицеролы из общего веса тела приходится 11 кг. Если бы это же количество энергии запасалось в виде гликогена, общий вес тела должен был быть на 55 кг больше.

У млекопитающих основным местом накопления триацилглицеролов является цитоплазма *жировых клеток.* Капли триацилглицерола сливаются, образуя большие глобулы, которые могут занимать большую часть клеточного объема. Жировые клетки специализированы для синтеза и хранения триацилглицеролов, а также для их мобилизации в качестве топливных молекул, способных переноситься кровью к другим тканям.

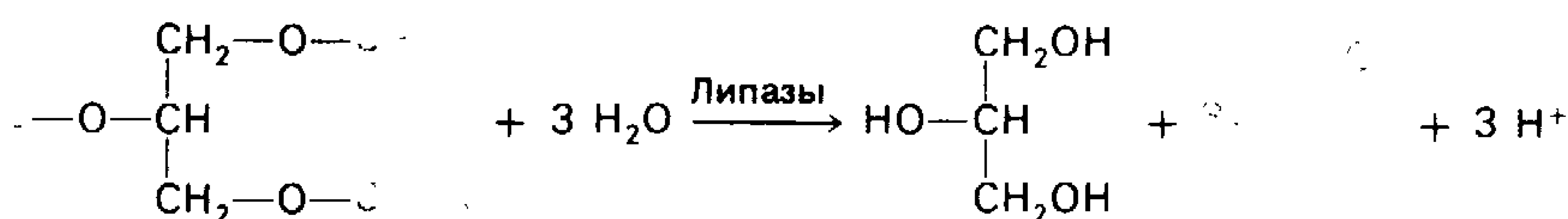
17.4. Триацилглицеролы гидролизуются липазами, регулируемыми циклическим АМР

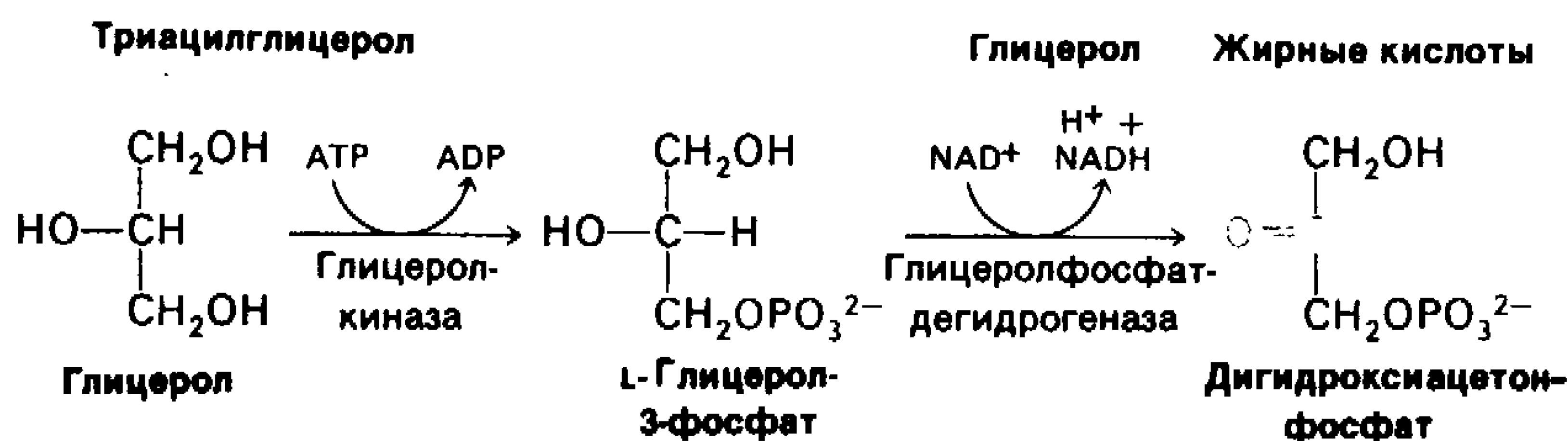
Первым этапом в использовании жира как источника энергии является гидролиз триацилглицерола под действием липаз. Активность липазы в жировой клетке регулируется гормонами. Адреналин, норадреналин, глюкагон и адренокортикотропный гормон стимулируют аденилатциклазу жировых клеток. Повышенное содержание циклического аденозинмонофосфата (циклического АМР) приводит далее к стимуляции протеинкиназы, которая активирует липазу путем ее фосфорилирования. Таким образом, адреналин, норадреналин, глюкагон и адренокортикотропный гормон вызывают липолиз. *Циклический АМР играет роль второго посредника в активации липолиза в жировых клетках*, которая аналогична его роли в активации распада гликогена (гл. 16). В отличие от перечисленных гормонов инсулин ингибирует липолиз.

Глицерол, образованный при липолизе, фосфорилируется и восстанавливается до дигидроксиацетонфосфата, который в свою очередь изомеризуется в глицеральдегид-3-фосфат. Последний служит промежуточным продуктом и гликолиза, и глюконеогенеза. Следовательно, в печени, содержащей соответствующие ферменты, глицерол может превращаться в пируват или глюкозу. Возможен и обратный процесс — восстановление дигидроксиацетонфосфата в глицерол-3-фосфат, который затем ги-



Рис. 17.2. Сканирующая электронная микрофотография жировой клетки. (Kessel R. G., Kardon R. H., Tissues and organs, 1979, W. H. Frieman and Company.)





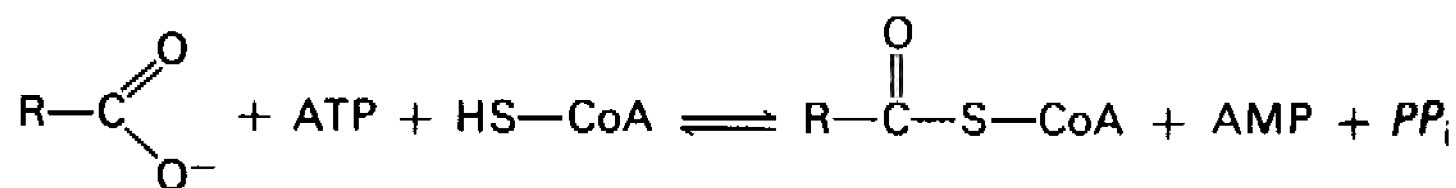
дролизуется фосфатазой с образованием глицерола. Таким образом, глицерол и промежуточные продукты гликолиза легко подвергаются взаимопревращению.

17.5. Жирные кислоты распадаются путем последовательного удаления двухуглеродных фрагментов

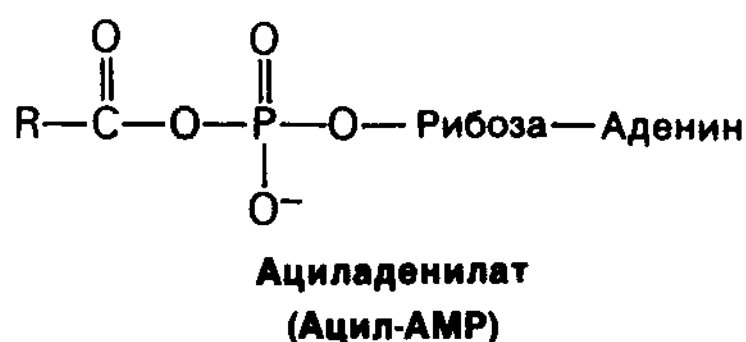
В 1904 г. Франц Кноп (Franz Knoop) сделал решающий вклад в выяснение механизма окисления жирных кислот. Он скармливал собакам жирные кислоты с неразветвленной цепью, в которых ω-углеродный атом был присоединен к фенильной группе. Кноп установил, что при скармливании собакам фенилбутирата в моче обнаруживается производное фенилуксусной кислоты, а при скармливании фенилпропионата – производное бензойной кислоты. Итак, скармливание жирной кислоты с четным числом атомов углерода сопровождалось образованием фенилуксусной кислоты, тогда как скармливание кислоты, содержащей нечетное число атомов углерода,– образованием бензойной кислоты (рис. 17.3). На основе этих данных Кноп пришел к выводу, что *жирные кислоты расщепляются путем окисления при β-углеродном атоме.* Описанные эксперименты представляют собою веху в развитии биохимии, поскольку в них впервые было использовано синтетическое меченое соединение для изучения биохимического механизма. Дейтерий и радиоактивные изотопы начали использоваться в биохимии несколькими десятилетиями позднее.

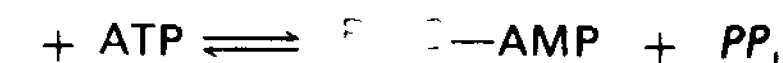
17.6. Окислению жирных кислот предшествует связывание с коферментом А

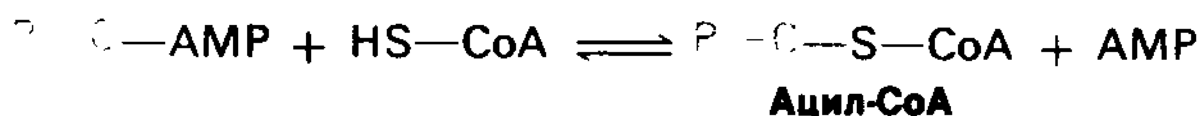
В 1949 г. Юджин Кеннеди и Альберт Ленинджер (Eugene Kennedy, Albert Lehninger) обнаружили, что окисление жирных кислот происходит в митохондриях. Последующие работы показали, что проникновению жирных кислот в митохондриальный матрикс предшествует их активация. Аденозинтрифосфат (ATP) стимулирует образование тиоэфирной связи между карбоксильной группой жирной кислоты и сульфгидрильной группой CoA. Эта реакция активации происходит в митохондриальной мембране, где она катализируется *ацил-CoA – синтетазой* (называемой также *тиокиназой жирных кислот*).

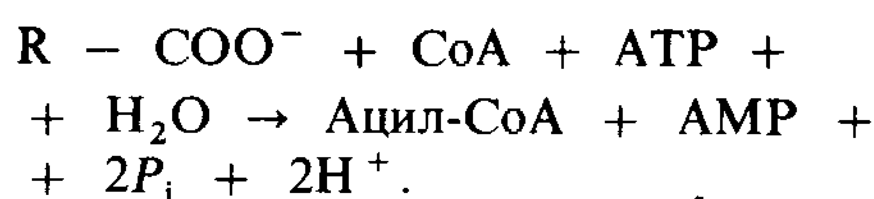


Пауль Берг (Paul Berg) установил, что активация жирной кислоты протекает в два этапа. Сначала жирная кислота реагирует с ATP с образованием *ациладенилата.* В этом смешанном ангидриде карбоксильная группа жирной кислоты присоединена к фосфорильной группе AMP. Другие две

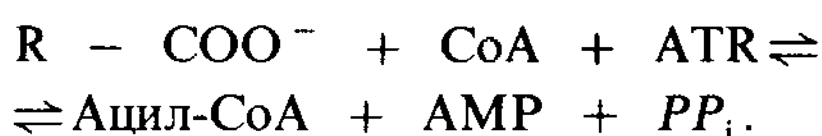




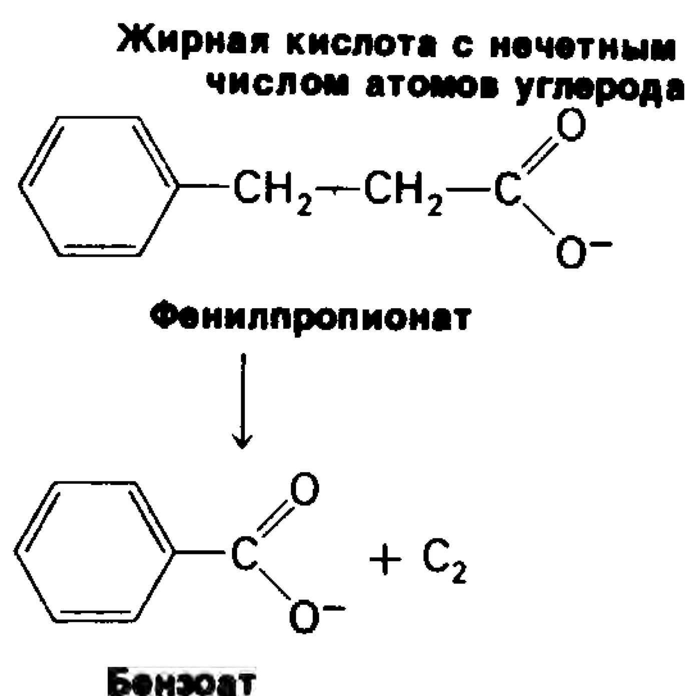




фосфорильные группы ATP-субстрата освобождаются в виде пирофосфата. Далее сульфгидрильная группа CoA действует на прочно связанный с ферментом ациладенилат с образованием ацил-CoA и AMP. Обе эти частичные реакции легкообратимы. Константа равновесия для суммарной реакции близка к 1.



$$\mathrm{R-COO^- + CoA + ATR \rightleftharpoons}$$
$$\mathrm{\rightleftharpoons Ацил\text{-}CoA + AMP} + PP_i.$$



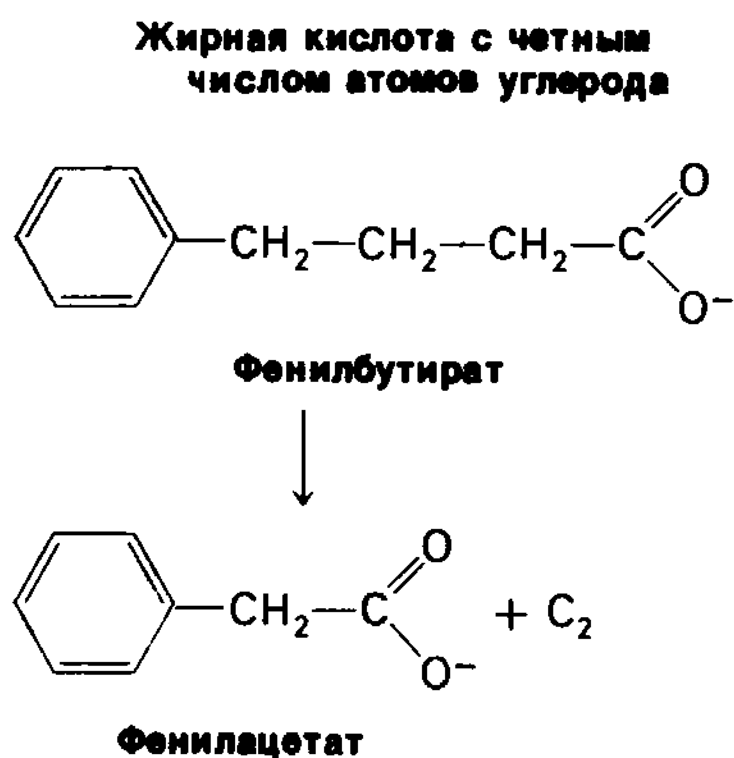


Рис. 17.3. Эксперимент Кнопа (Knoop), показывающий, что жирные кислоты распадаются путем отщепления двухуглеродных фрагментов.

В ходе описанных превращений одна высокоэнергетическая связь разрушается (связь между PP_i и AMP) и одна образуется (тиоэфирная связь в ацил-CoA). Каким образом запускается эта реакция? Ответом на этот вопрос может служить тот факт, что пирофосфат быстро гидролизуется под действием пирофосфатазы.

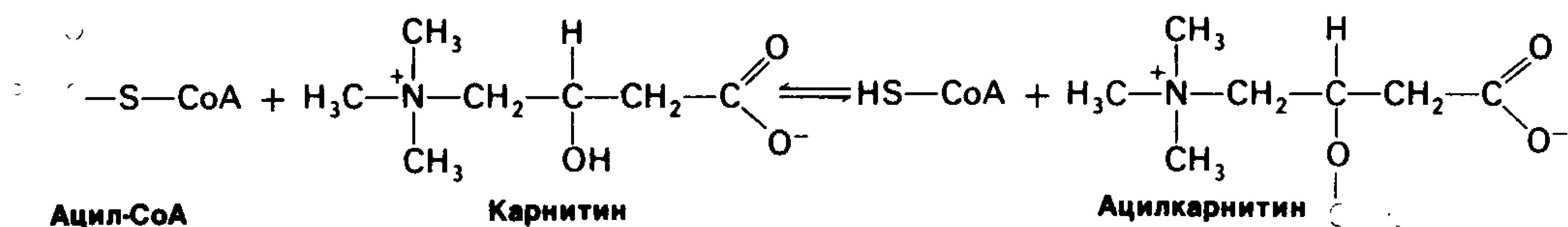
$$\mathrm{R-COO^- + CoA + ATP +}$$
$$\mathrm{+ H_2O \rightarrow Ацил\text{-}CoA + AMP +}$$
$$+\ 2P_i + 2H^+.$$

В результате вся реакция оказывается необратимой, поскольку потребляются две высокоэнергетические связи, а образуется лишь одна. Мы видим здесь еще один пример повторяющегося в биохимии мотива: *многие биосинтетические реакции становятся необратимыми вследствие гидролиза неорганического пирофосфата.*

Другой повторяющийся мотив касается реакции активации. Наличие связанного с ферментом ациладенилатного промежуточного продукта присуще не только синтезу ацил-CoA. *Ациладенилаты часто образуются при активации карбоксильных групп в биохимических реакциях.* Например, именно при помощи такого механизма происходит активация аминокислот для синтеза белка.

17.7. Карнитин переносит в митохондриальный матрикс активированные жирные кислоты с длинной цепью

Жирные кислоты активируются на наружной митохондриальной мембране, а окисляются в митохондриальном матриксе. Будучи молекулой с длинной цепью, ацил-CoA не может проходить легко через внутреннюю митохондриальную мембрану. Для этого необходим специальный механизм транспорта. Переносчиком активированных жирных кислот с длинной цепью через внутреннюю митохондриальную мембрану служит *карнитин.* Ацильная группа переносится с атома серы CoA на гидроксильную группу карнитина с обра-



зованием *ацилкарнитина*, который диффундирует через внутреннюю митохондриальную мембрану. На той стороне этой мембраны, которая обращена к матриксу, ацильная группа переносится обратно на СоА, что термодинамически выгодно, поскольку О-ацильная связь в карнитине обладает высоким потенциалом переноса группы. Эти реакции трансацетилирования катализируются *ацил-СоА: карнитин — ацилтрансферазой.*

Можно было думать, что у людей с дефектом данной трансферазы или недостаточностью карнитина должно быть нарушено окисление жирных кислот с длинной цепью. Такое нарушение действительно было обнаружено у идентичных близнецов, у которых с раннего детства наблюдались болезненные мышечные судороги. Боли снимались при голодании, упражнениях и при потреблении богатой жиром пищи; во всех этих трех состояниях основным процессом, обеспечивающим энергию, является окисление жирных кислот. Ферменты гликолиза и гликогенолиза не отличались от нормы. Липолиз триацилглицеролов также был в пределах нормы, о чем свидетельствовало повышение концентрации неэтерифицированных жирных кислот в плазме после голодания. Анализ биопсийного материала мышечной ткани показал, что синтетаза СоА-производных жирных кислот (ацил-СоА) с длинной цепью была полностью активна. Кроме того, нормально протекал метаболизм жирных кислот со средней длиной цепи (C_8 и C_{10}). Известно, что для проникновения в митохондриальный матрикс ацил-СоА со средней длиной цепи карнитина не требуется. Описанный случай отчетливо показывает, что *нарушение перехода метаболита из одного клеточного компартмента в другой может явиться причиной болезни.*

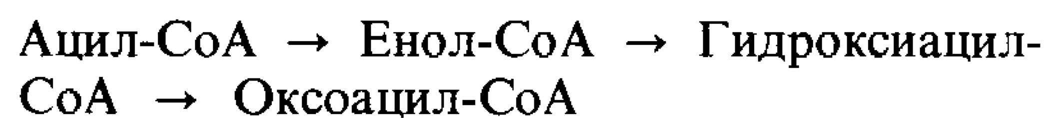
17.8. В каждом цикле окисления жирной кислоты происходит генерирование ацетил-СоА, NADH и $FADH_2$

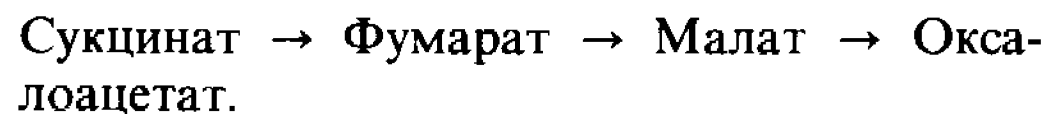
Насыщенный ацил-СоА распадается в результате повторяющейся последовательности из четырех реакций: окисления с участием флавинадениндинуклеотида (FAD) гидратации, окисления с участием NAD^+ и тиолиза с участием СоА (рис. 17.4). Цепь жирной кислоты укорачивается при этом на два атома углерода, и происходит генерирование $FADH_2$, NADH и ацетил-СоА. Дэвид Грин (David Green), Северо Очоа (Severo Ochoa) и Феодор Линен (Feodor Lynen) внесли большой вклад в изучение этой последовательности реакций, назвав его *путем β-окисления.*

Первой реакцией в каждом цикле распада ацил-СоА является его *окисление* ацил-СоА — дегидрогеназой, приводящее к образованию еноил-СоА с *транс*-двойной связью между С-2 и С-3.

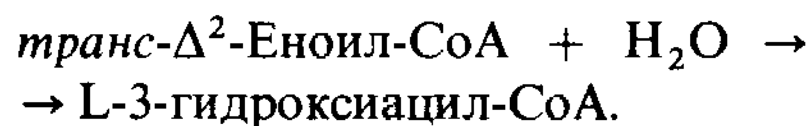

Ацил-СоА + E-FAD → *транс*-Δ^2-Еноил-СоА + E-$FADH_2$.

Интересно отметить, что дегидрирование ацил-СоА очень сходно с дегидрированием сукцината в цикле трикарбоновых кислот. Действительно, первые три реакции в каждом цикле расщепления жирной кислоты близко напоминают последние стадии в цикле трикарбоновых кислот:

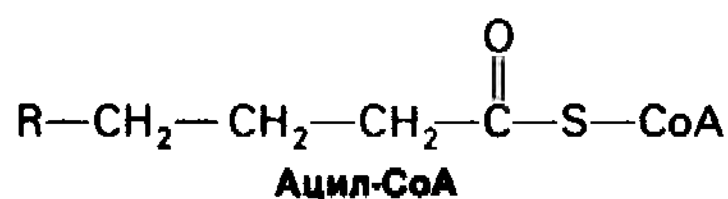

Ацил-СоА → Енол-СоА → Гидроксиацил-СоА → Оксоацил-СоА

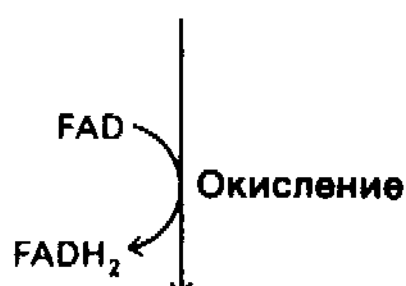

Сукцинат → Фумарат → Малат → Оксалоацетат.

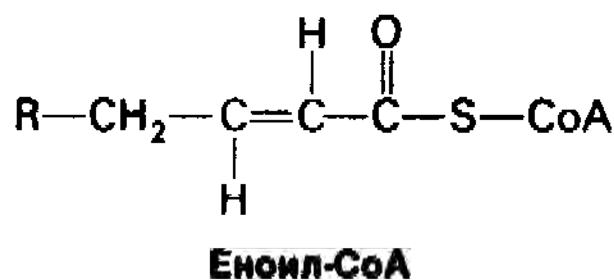
Следующий этап — *гидратация* двойной связи между С-2 и С-3 под действием еноил-СоА—гидратазы.

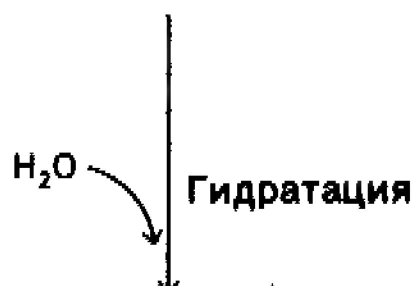

транс-Δ^2-Еноил-СоА + H_2O → L-3-гидроксиацил-СоА.

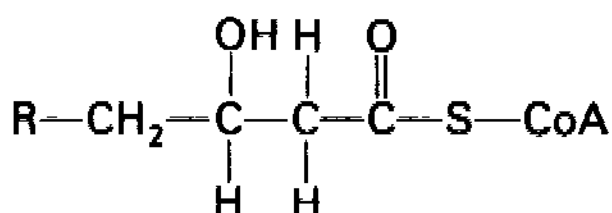
Гидратация еноил-СоА стереоспецифична, подобно гидратации фумарата и аконитата. В результате гидратации *транс*-Δ^2-двойной связи образуется только L-изомер 3-гидроксиацил-СоА. Фермент гидратирует также *цис*-Δ^2-двойную связь, но в этом случае продуктом реакции является D-изомер. Мы еще вернемся вкратце к этому

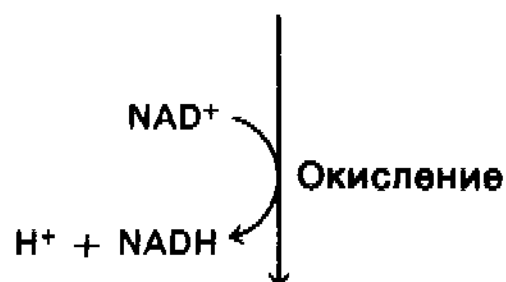


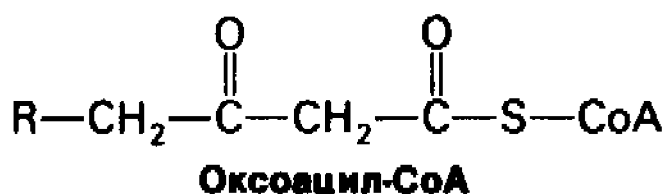


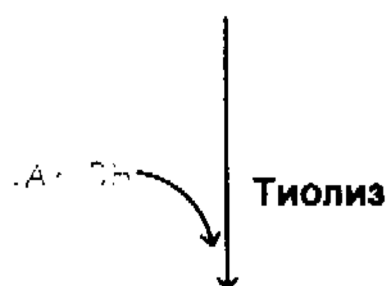












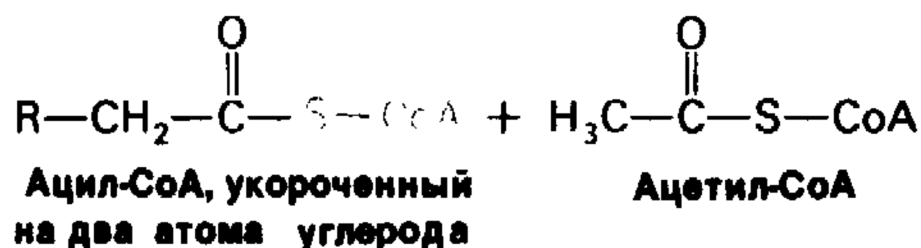
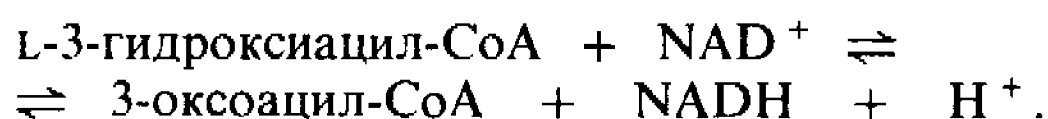


Рис. 17.4. Последовательность реакций при расщеплении жирных кислот: окисление, гидратация, окисление и тиолиз.

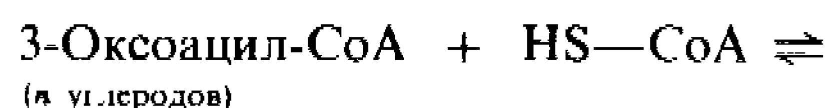
моменту при обсуждении окисления ненасыщенных жирных кислот.

Гидратация еноил-CoA предшествует второй реакции *окисления*, при которой гидроксильная группа при C-3 превращается в оксогруппу и происходит генерирование NADH. Эта реакция катализируется L-3-гидроксиацил-CoA -дегидрогеназой, обладающей абсолютной специфичностью в отношении L-изомера гидроксиацильного субстрата.



$$\text{L-3-гидроксиацил-CoA} + NAD^{+} \rightleftharpoons \text{3-оксоацил-CoA} + NADH + H^{+}.$$

В ходе предыдущих реакций происходило окисление метиленовой группы при C-3 в оксогруппу. Последняя стадия представляет собою *расщепление* 3-оксоацил-CoA тиоловой группой второй молекулы CoA, продуктами которого являются ацетил-CoA и ацил-CoA, укороченные на два атома углерода. Это тиолитическое расщепление катализируется β-кетотиолазой.



$$\underset{(n\ \text{углеродов})}{\text{3-Оксоацил-CoA}} + HS\text{—CoA} \rightleftharpoons$$

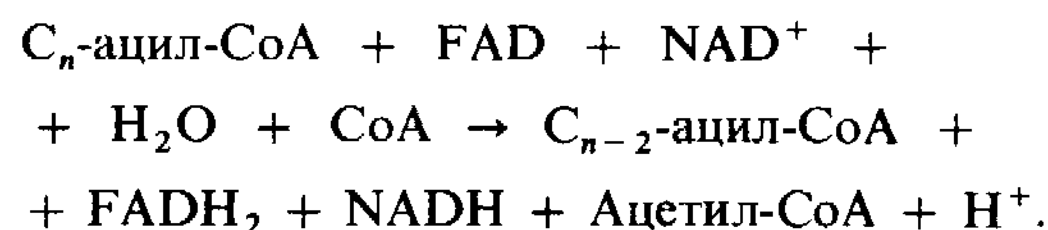


$$\rightleftharpoons \text{Ацетил-CoA} + \underset{(n-2\ \text{углеродов})}{\text{Ацил-CoA}}.$$

Укороченный ацил-CoA подвергается далее следующему циклу окисления, начинающему с реакции, катализируемой ацил-CoA – дегидрогеназой (рис. 17.5). Бета-кетотиолаза гидроксиацил-дегидрогеназа и еноил-CoA – гидратаза обладают широкой специфичностью в отношении длины ацильной группы.

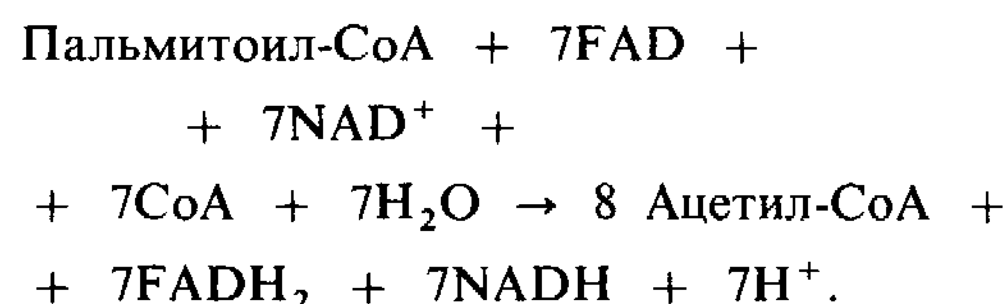
17.9. При полном окислении пальмитата образуется 129 ATP

Мы можем вычислить, каков выход энергии при окислении жирной кислоты. В каждом цикле реакций ацил-CoA укорачивается на два углерода и образуется по одной молекуле $FADH_2$, NADH и ацетил-CoA.



$$C_n\text{-ацил-CoA} + FAD + NAD^{+} + H_2O + CoA \rightarrow C_{n-2}\text{-ацил-CoA} + FADH_2 + NADH + \text{Ацетил-CoA} + H^{+}.$$

Расщепление пальмитоил-CoA (C_{16}-ацил-CoA) требует семи циклов. В седьмом цикле C_4-оксоацил-CoA расщепляется путем тиолиза на две молекулы ацетил-CoA. В итоге получаем следующую стехиометрию окисления пальмитоил-CoA:



$$\text{Пальмитоил-CoA} + 7FAD + 7NAD^{+} + 7CoA + 7H_2O \rightarrow 8\ \text{Ацетил-CoA} + 7FADH_2 + 7NADH + 7H^{+}.$$

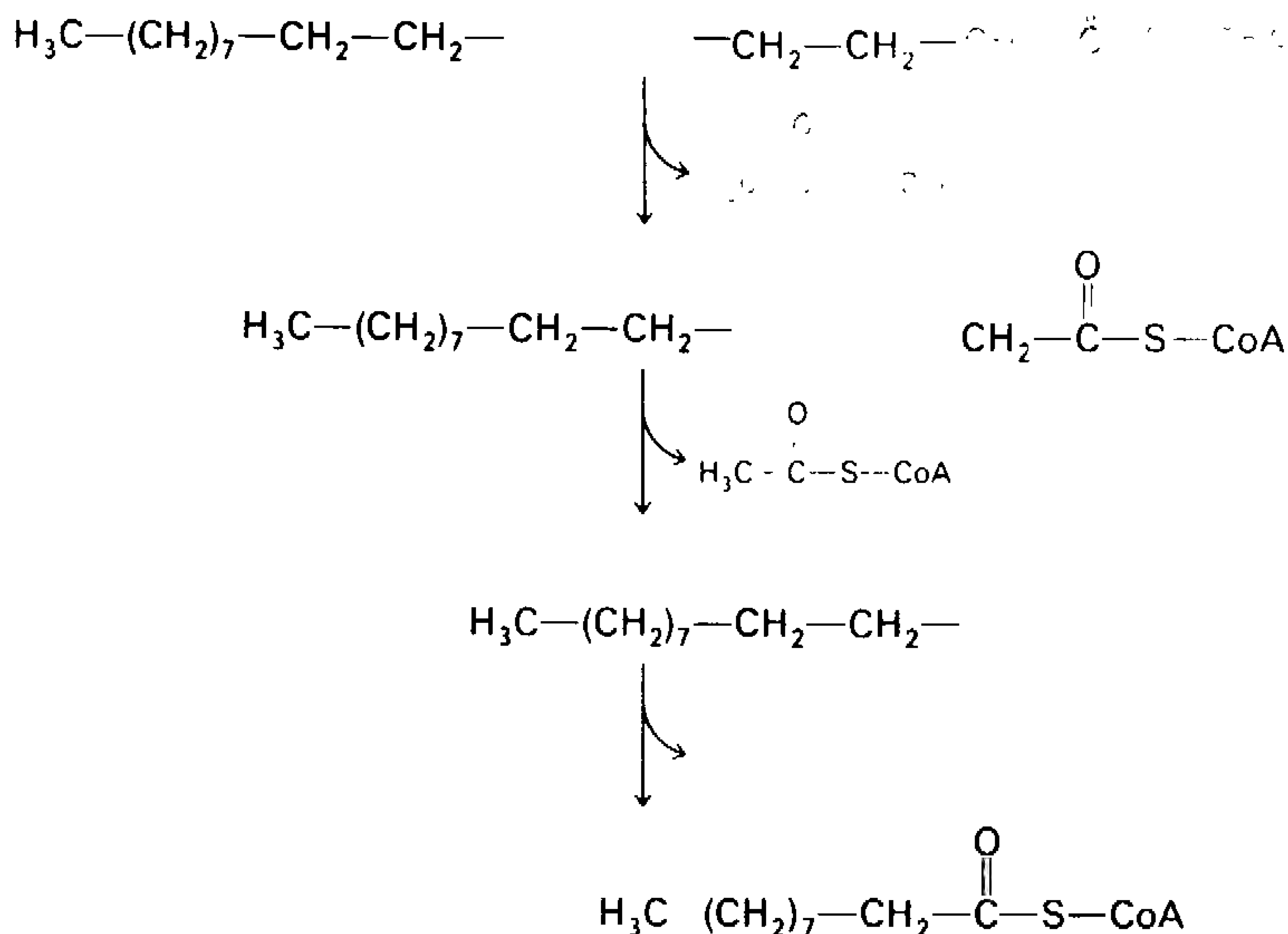


Рис. 17.5. Первые три цикла при расщеплении пальмитата. Двухуглеродные фрагменты последовательно удаляются с карбоксильного конца жирной кислоты.

При окислении каждого из этих NADH через дыхательную цепь образуются три АТР, тогда как при окислении каждого $FADH_2$ – два АТР, потому что в этом случае электроны поступают в цепь на уровне кофермента Q. Напомним, что окисление ацетил-СоА в цикле трикарбоновых кислот дает 12 АТР. Значит, количество молекул АТР, образованного при окислении пальмитоил-СоА, составит: 14 из 7 $FADH_2$, 21 из 7NADH и 96 из 8 молекул ацетил-СоА, что равно в сумме 131. Две высокоэнергетические фосфатные связи потребляются для активации пальмитата, когда АТР расщепляется на АМР и $2P_i$. Таким образом, *чистый выход АТР в результате полного окисления пальмитата составляет 129 молекул.*

Эффективность запасания энергии при окислении жирных кислот можно измерить, исходя из количества образованного АТР и свободной энергии окисления пальмитиновой кислоты до CO_2 и H_2O, определяемой калориметрическим путем. Стандартная свободная энергия гидролиза 129 АТР равна – 940 ккал (129 × – 7,3 ккал). Стандартная свободная энергия окисления пальмитата равна – 2340 ккал. Следовательно, *эффективность накопления энергии в резуль-*

Таблица 17.2. **Основные реакции в окислении жирных кислот**

Стадия	Реакция	Фермент
1	Жирная кислота + + СоА + АТР ⇌ ⇌ Ацил-СоА + + АМР + PP_i	Ацил-СоА—синтетаза (называемая также тиокиназа жирных кислот, жирная кислота: СоА-лигаза [АМР])
2	Карнитин + Ацил-СоА ⇌ Ацилкарнитин + СоА	Ацил-СоА: карнитин—ацилтрансфераза
3	Ацил-СоА + E-FAD → *транс*-Δ^2-еноил-СоА + E-$FADH_2$	Ацил-СоА—дегидрогеназа (некоторые ферменты с различной специфичностью в отношении длины цепи)
4	*транс*-Δ^2-Еноил-СоА + H_2O ⇌ L-3-гидроксиацил-СоА	Еноил-СоА—гидратаза (называемая также кротоназа или 3-гидроксиацил-СоА—гидролиаза)
5	L-3-гидроксиацил-СоА + NAD^+ ⇌ 3-оксоацил-СоА + + NADH + H^+	L-3-гидроксиацил-СоА дегидрогеназа
6	3-оксоацил-СоА + СоА ⇌ Ацетил-СоА + + Ацил-СоА (укороченный на C_2)	β-Кетотиолаза (называемая также тиолаза)

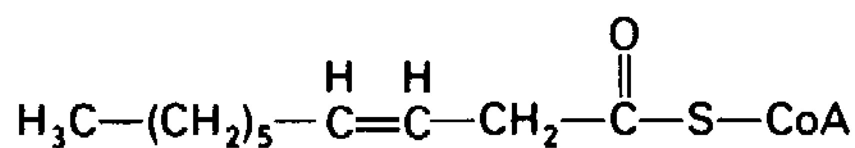
тате окисления жирных кислот при стандартных условиях составляет около 40%, что близко к этой величине для гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования.

17.10. Необходимость изомеразы и эпимеразы для окисления ненасыщенных жирных кислот

Обратимся теперь к окислению ненасыщенных жирных кислот. Многие из происходящих при этом реакций идентичны таковым для насыщенных жирных кислот. Действительно, для расщепления большого числа ненасыщенных жирных кислот требуются только два добавочных фермента – изомераза и эпимераза.

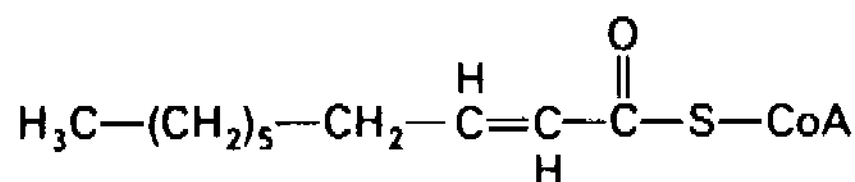
Рассмотрим окисление пальмитолеата. Эта ненасыщенная жирная C_{16}-кислота, имеющая одну двойную связь между С-9 и С-10, активируется и транспортируется через внутреннюю митохондриальную мембрану таким же образом, как пальмитат. Пальмитолеил-CoA претерпевает далее три цикла расщепления, катализируемые теми же ферментами, что и окисление насыщенных жирных кислот. Однако *цис*-Δ^3-еноил-CoA, образуемый в третьем цикле, не является субстратом для ацил-CoA-дегидрогеназы. Наличие двойной связи между С-3 и С-4 предотвращает образование другой двойной связи, между С-2 и С-3. Это препятствие преодолевается с помощью новой реакции, которая сдвигает положение и конфигурацию *цис*-Δ^3-двойной связи. *Под действием изомеразы эта двойная связь превращается в транс-Δ^2-двойную связь.* Последующие реакции подобны реакциям пути окисления насыщенных жирных кислот, когда *транс*-Δ^2-еноил-CoA является обычным субстратом.

Для окисления полиеновых жирных кислот необходим и второй добавочный фермент. Активированная ненасыщенная жирная C_{18}-кислота с двойными *цис*-Δ^{16}- и цис-Δ^9-связями претерпевает два цикла деградации по пути окисления насыщенных жирных кислот. Затем *цис*-Δ^2, Δ^5-еноил-CoA гидратируется еноил-CoA-гидратазой, тем же ферментом, который гидратирует двойную *транс*-Δ^2-связь при окислении насыщенных жирных кислот. Однако гидратирование двойной цис-Δ^2-связи дает D-изомер 3-гидроксиацил-CoA, который не может служить субстратом для L-3-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназы. Это затруднение снимается *эпимеразой, обращающей конфигурацию гидроксильной группы при С-3.*



цис-Δ^3-Еноил-CoA

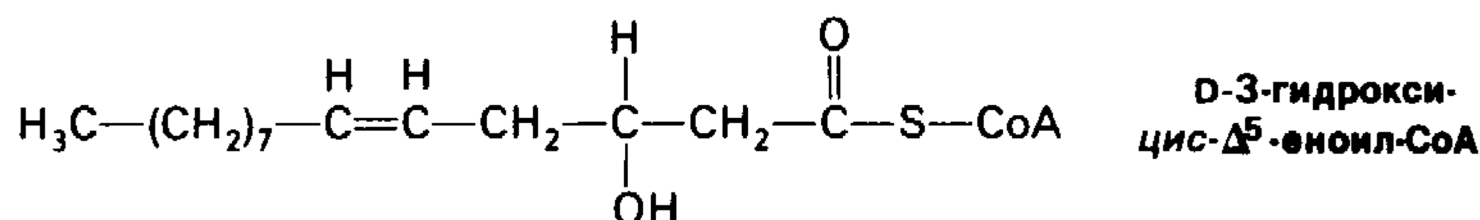
Изомераза



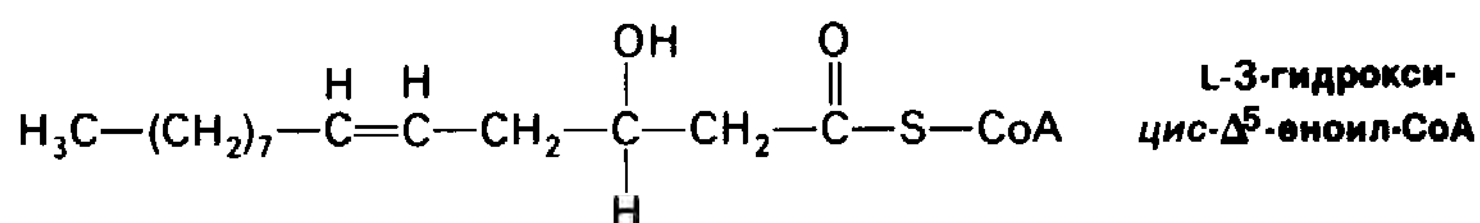
транс-Δ^2-Еноил-CoA

17.11. Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуют при завершающем тиолизе пропионил-CoA

Жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов насчитывается немного. Они окисляются таким же образом, как и жирные кислоты с четным числом атомов, с той лишь разницей, что на последнем этапе расщепления образуются одна молекула пропионил-CoA и одна молекула ацетил-CoA, а не две молекулы ацетил-CoA. Активированный трехуглеродный фрагмент пропионил-CoA включается в цикл трикарбоновых кислот после превращения в сукцинил-CoA. Путь от пропионил-CoA к сукци-



Эпимераза



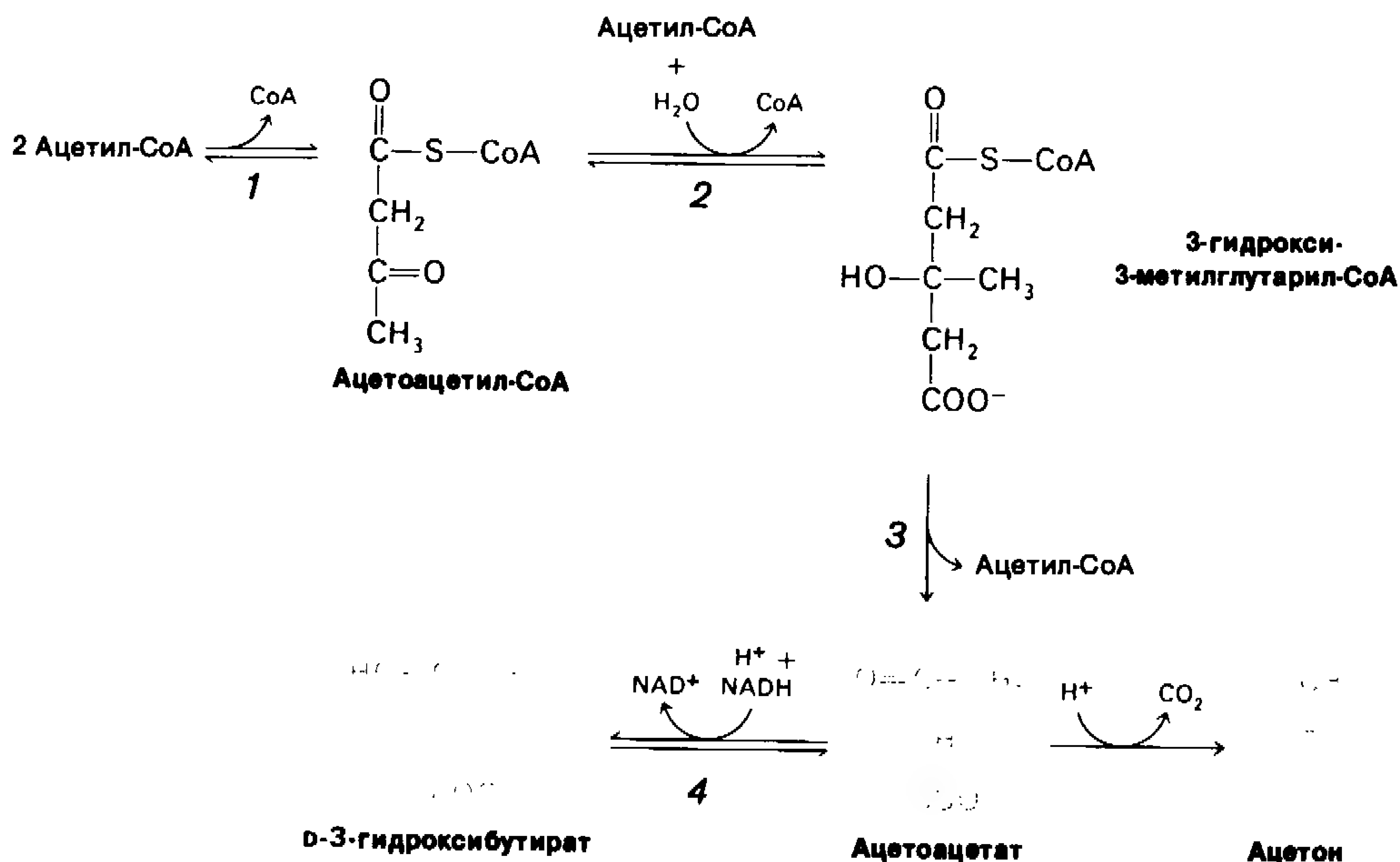
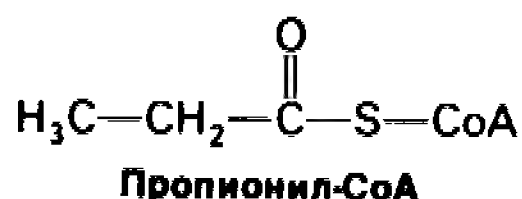


Рис. 17.6. Образование ацетоацетата, D-3-гидроксибутирата и ацетона из ацетил-СоА. Ферменты, катализирующие эти реакции: *1* – 3-кетотиолаза, *2* – гидроксиметилглутарил-СоА – синтетаза, *3* – гидроксиметилглутарил-СоА – лиаза и *4* – D-3-гидроксибутират – дегидрогеназа. Ацетоацетат спонтанно декарбоксилируется с образованием ацетона.

нил-СоА рассматривается в следующей главе (разд. 18.11), поскольку пропионил-СоА образуется также при окислении некоторых аминокислот.



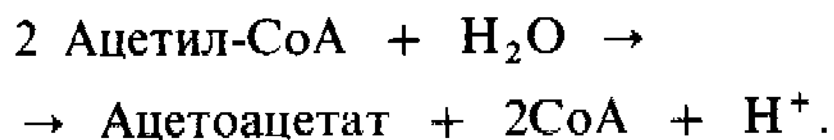
Пропионил-СоА

17.12. Образование кетоновых тел из ацетилкофермента А в условиях, когда расщепление жиров преобладает

Ацетил-СоА, образовавшийся при окислении жирных кислот, включается в цикл трикарбоновых кислот в условиях, когда расщепление жиров и углеводов соответствующим образом сбалансировано. Теперь уже ясна молекулярная основа изречения, что *жиры сгорают в пламени углеродов*. Включение ацетил-СоА в цикл зависит от доступности оксалоацетата для образования цитрата. Однако, если расщепление жиров преобладает, судьба ацетил-СоА изменяется. Объясняется это тем, что в отсутствие углеводов или при нарушении их использования концентрация оксалоацетата снижается. В случае голодания или диабета оксалоацетат расходуется на образование глюкозы и поэтому не может конденсироваться с ацетил-СоА. В таких условиях путь метаболизма ацетил-СоА отклоняется в сторону образования ацетоацетата и D-3-гидроксибутирата. Ацетоацетат, D-3-гидроксибутират и ацетон часто называют *кетоновыми телами*.

Ацетоацетат образуется из ацетил-СоА в три стадии (рис. 17.6). Две молекулы ацетил-СоА конденсируются с образованием ацетоацетил-СоА. Эта реакция, катализируемая тиолазой, представляет собою обращение тиолизной стадии в окислении жирных кислот. Ацетоацетил-СоА реагирует далее с ацетил-СоА и H_2O, образуя 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА и СоА. Неблагоприятное равновесие в образовании ацетоацетил-СоА компенсируется благоприятным равновесием этой последней реакции, обусловленным гидролизом тиоэфирной связи. 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА затем расщепляется на ацетил-СоА и ацетоацетат. Суммарная реакция этих пре-

вращений имеет следующий вид:



$$2\ \text{Ацетил-CoA} + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Ацетоацетат} + 2\text{CoA} + H^+.$$

При восстановлении ацетоацетата в митохондриальном матриксе образуется 3-гидроксибутират. Отношение гидроксибутирата к ацетоацетату зависит от отношения [NADH]/[NAD$^+$] в митохондриях. Ацетоацетат претерпевает также медленное спонтанное декарбоксилирование в ацетон. У людей с высоким содержанием ацетоацетата в крови в выдыхаемом воздухе может ощущаться запах ацетона.

17.13. Ацетоацетат – основное топливо в некоторых тканях

Основным местом образования ацетоацетата и 3-гидроксибутирата служит печень. Из митохондрий печени эти соединения диффундируют в кровь и переносятся к периферическим тканям. Еще несколько лет назад считалось, что кетоновые тела – это продукты расщепления, не имеющие существенного физиологического значения. Исследования Георга Кэхилла (George Cahill) и других показали, однако, что эти производные ацетил-CoA играют важную роль в энергетическом обмене. *Ацетоацетат и 3-гидроксибутират в норме выполняют роль дыхательного топлива и являются количественно важными источниками энергии.* Действительно, сердечная мышца и корковый слой почек предпочтительно используют ацетоацетат, а не глюкозу. В противоположность этому глюкоза является главным топливом для мозга у лиц, получающих обильную сбалансированную пищу. Тем не менее при голодании и диабете мозг адаптируется к использованию ацетоацетата. В условиях длительного голодания 75% потребности мозга в топливе удовлетворяется за счет ацетоацетата.

Ацетоацетат может быть активирован путем переноса CoA с сукцинил-CoA в реакции, катализируемой специфической CoA-трансферазой. Ацетоацетил-CoA далее расщепляется тиолазой с образованием двух молекул ацетил-CoA, которые могут затем включиться в цикл трикарбоновых кислот. Печень может снабжать ацетоацетатом другие органы, поскольку в ней отсутствует специфическая CoA-трансфераза.

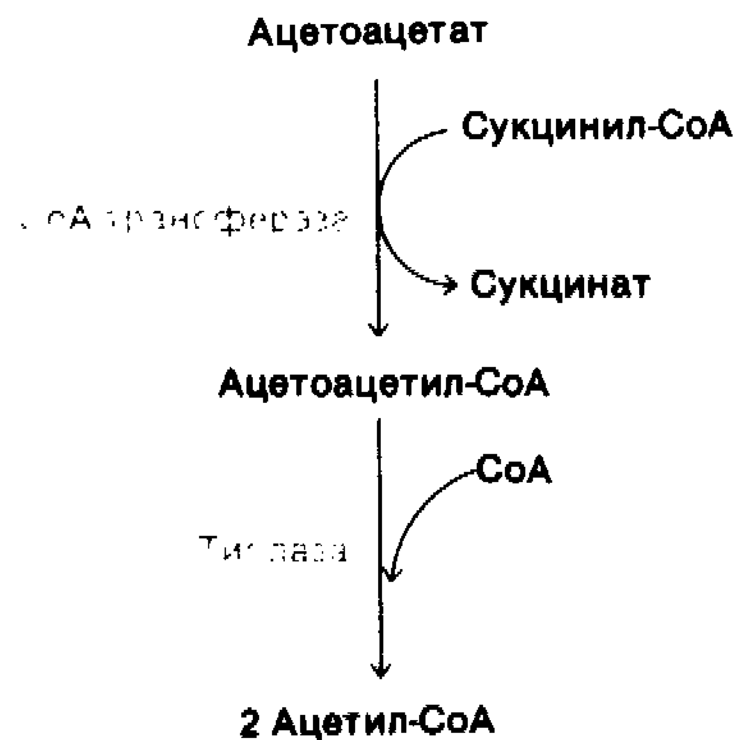
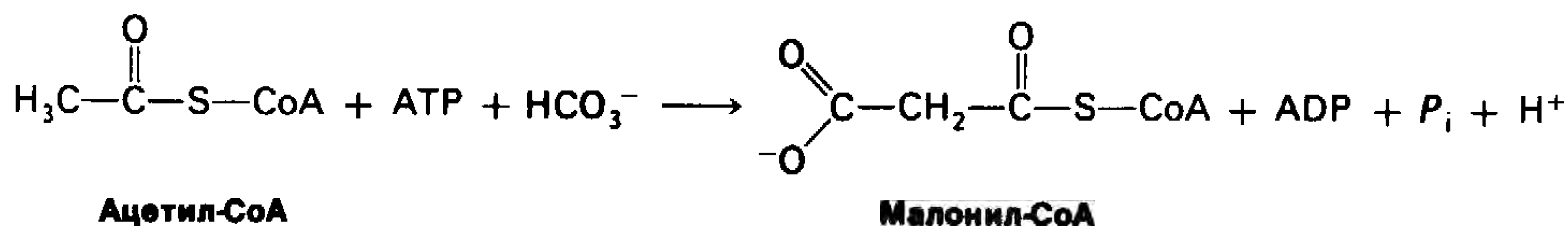


Рис. 17.7. Использоваоие ацетоацетата в качестве топлива. Ацетоацетат может превратиться в две молекулы ацетил-CoA, которые затем включаются в цикл трикарбоновых кислот.

Ацетоацетат можно рассматривать как водорастворимую транспортируемую форму ацетильных компонентов. Жирные кислоты высвобождаются жировой тканью и превращаются в ацетильные компоненты печенью, которая затем экспортирует их в виде ацетоацетата. Как и можно было предвидеть, ацетоацетат играет и регуляторную роль. *Высокое содержание ацетоацетата в крови означает изобилие ацетильных компонентов и приводит к снижению скорости липолиза в жировой ткани.*

17.14. Животные неспособны превращать жирные кислоты в глюкозу

Важно отметить, что *животные неспособны превращать жирные кислоты в глюкозу.* Ацетил-CoA не может превратиться в организме животных в пируват или оксалоацетат. Два углеродных атома ацетильной группы ацетил-CoA включаются в цикл трикарбоновых кислот, но два атома углерода покидают этот цикл в ходе реакций декарбоксилирования, катализируемых изоцитрат-дегидрогеназой и α-оксоглутарат – дегидрогеназой. Следовательно, оксалоацетат регенерируется, но не образуется заново при окислении ацетильного компонента ацетил-CoA в цикле трикарбоновых кислот. В отличие от животных растения обладают двумя дополнительными ферментами, обусловливающими их способность к превращению углеродных атомов ацетил-CoA в глюкозу (см. задачу 6 на стр. 159).



$$H_3C-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA + ATP + HCO_3^- \longrightarrow {}^-O(O=)C-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA + ADP + P_i + H^+$$

17.15. Синтез и распад жирных кислот идут различными путями

Путь синтеза жирных кислот – это отнюдь не обращение пути их расщепления. Он представляет собою новую последовательность реакций, что служит еще одним примером *различий путей синтеза и расщепления в биологических системах.* Рассмотрим некоторые важные особенности пути биосинтеза жирных кислот.

1. Синтез происходит в *цитозоле* в отличие от распада, который протекает в митохондриальном матриксе.

2. Промежуточные продукты синтеза жирных кислот ковалентно связаны с сульфгидрильными группами *ацилпереносящего белка* (АПБ), тогда как промежуточные продукты расщепления жирных кислот связаны с коферментом А.

3. Многие ферменты синтеза жирных кислот у высших организмов организованы в *мультиферментный комплекс*, называемый *синтетазой жирных кислот.* В противоположность им ферменты, катализирующие расщепление жирных кислот, по-видимому, не склонны к ассоциации.

4. Растущая цепь жирной кислоты удлиняется путем *последовательного присоединения двухуглеродных компонентов*, происходящих из ацетил-СоА. Активированным донором двухуглеродных компонентов на стадии элонгации служит *малонил-АПБ.* Реакция элонгации запускается высвобождением CO_2.

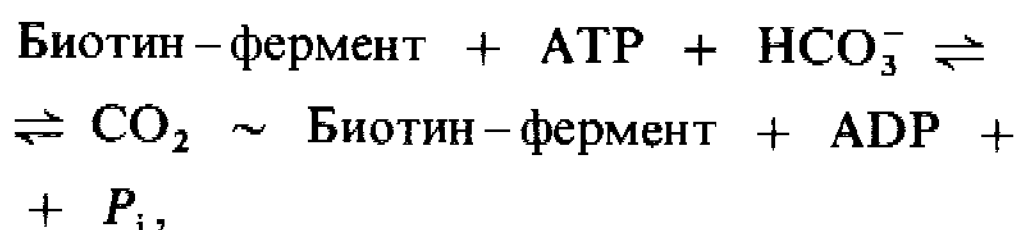
5. Роль восстановителя при синтезе жирной кислоты выполняет *NADPH.*

6. Элонгация под действием комплекса синтетазы жирных кислот останавливается на этапе образования *пальмитата* (C_{16}). Дальнейшая элонгация и введение двойных связей осуществляются другими ферментными системами.

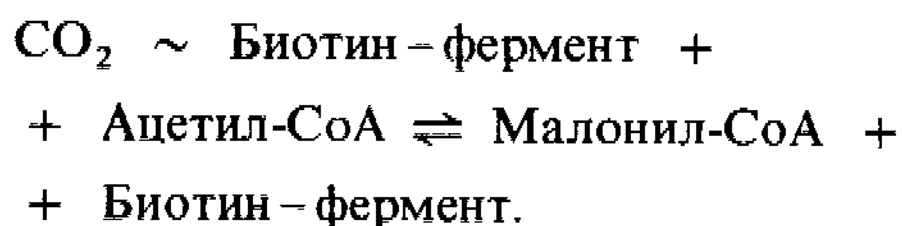
17.16. Образование малонилкофермента А – решающий шаг в синтезе жирных кислот

Обнаруженная Сэли Уейкил (Salih Wakil) потребность в бикарбонате для биосинтеза жирных кислот оказалась ключом к раскрытию механизма этого процесса. Действительно, синтез жирных кислот начинается с карбоксилирования ацетил-СоА в *малонил-СоА.* Эта необратимая реакция представляет собою решающий этап в синтезе жирных кислот.

Синтез малонил-СоА катализируется *ацетил-СоА – карбоксилазой*, содержащей в качестве простетической группы биотин. Карбоксильная группа биотина ковалентно присоединяется к ε-аминогруппе остатка лизина, как это имеет место в пируваткарбоксилазе (разд. 15.15). Еще одно общее свойство ацетил-СоА – карбоксилазы и пируваткарбоксилазы заключается в том, что карбоксилирование ацетил-СоА происходит в две стадии. Сначала за счет АТР образуется в качестве промежуточного продукта карбоксибиотин. Активированная CO_2-группа в составе этого промежуточного продукта затем переносится на ацетил-СоА с образованием малонил-СоА.



$$\text{Биотин – фермент} + ATP + HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2 \sim \text{Биотин – фермент} + ADP + P_i,$$



$$CO_2 \sim \text{Биотин – фермент} + \text{Ацетил-СоА} \rightleftharpoons \text{Малонил-СоА} + \text{Биотин – фермент}.$$

Связывание субстратов с ферментом и освобождение продуктов происходят со специфической последовательностью (рис. 17.8). Ацетил-СоА – карбоксилаза представляет

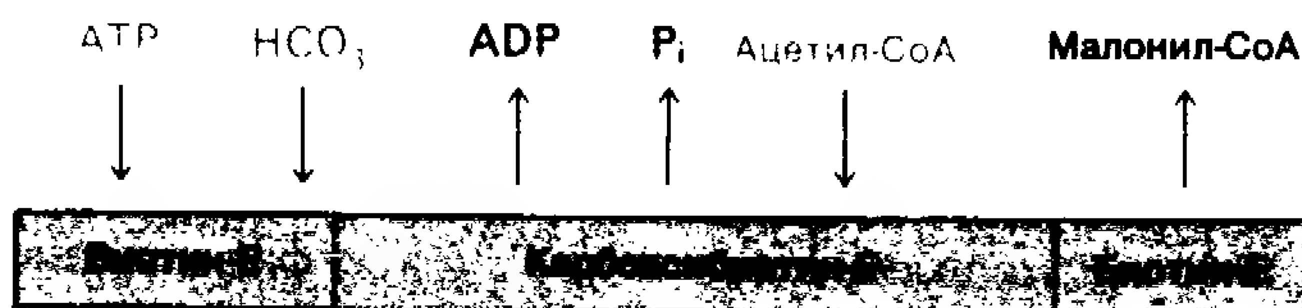


Рис. 17.8. Последовательность реакций, катализируемых ацетил-СоА – иарбоксилазой.

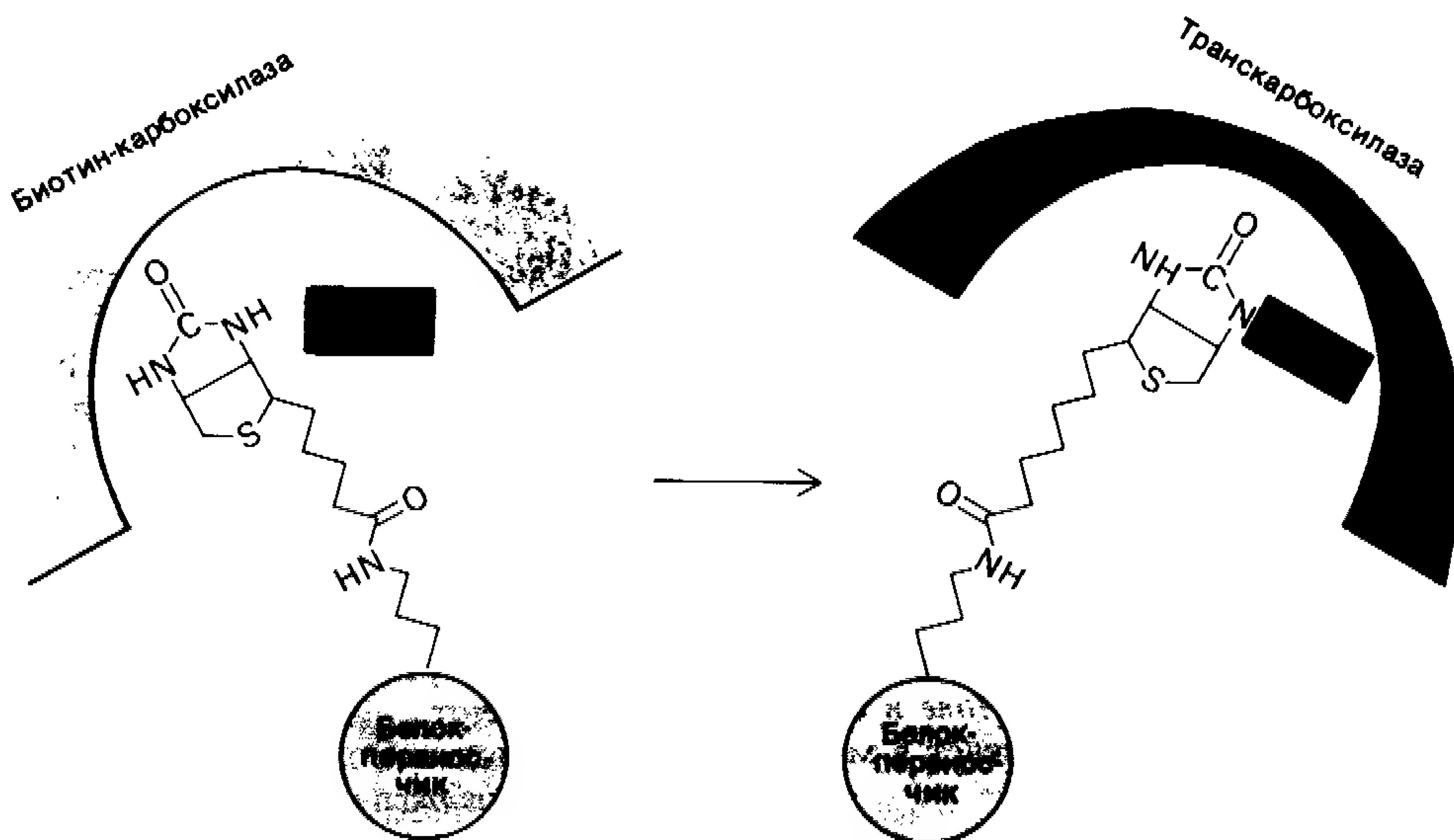


Рис. 17.9. Схема, показывающая предполагаемое перемещение биотиновой простетической группы от места, где она присоединяет карбоксильную группу от HCO_3^-, к месту, где она отдает эту группу ацетил-СоА.

пример *механизма реакции по типу «пинг-понга»*, когда освобождение одного или более продуктов реакции происходит до того, как все субстраты будут связаны.

Ацетил-СоА-карбоксилаза из *E.coli* была разделена на субъединицы, катализирующие частичные реакции. Биотин ковалентно присоединяется к небольшому белку (22 кДа), называемому *карбоксибиотин-переносящий белок*. Карбоксилирование биотинового компонента в образованном комплексе катализируется второй субъединицей-*биотин-карбоксилазой*. Третьим компонентом системы является *транскарбоксилаза*, которая катализирует перенос активированного CO_2 от карбоксибиотина на ацетил-СоА. Длина и гибкость связи между биотином и переносящим его белком обусловливают возможность перемещения активированной карбоксильной группы от одного активного центра ферментного комплекса к другому (рис. 17.9), как это имеет место в пируват-карбоксилазе (разд. 15.16).

У эукариот ацетил-СоА-карбоксилаза существует в виде лишенного ферментативной активности протомера (450 кДа) или в виде активного нитевидного полимера (рис. 17.10). Их взаимопревращение регулируется аллостерически, как и следовало ожидать, поскольку ацетил-СоА-карбоксилаза катализирует первый решающий этап в синтезе жирных кислот. *Ключевым аллостерическим активатором служит цитрат,*

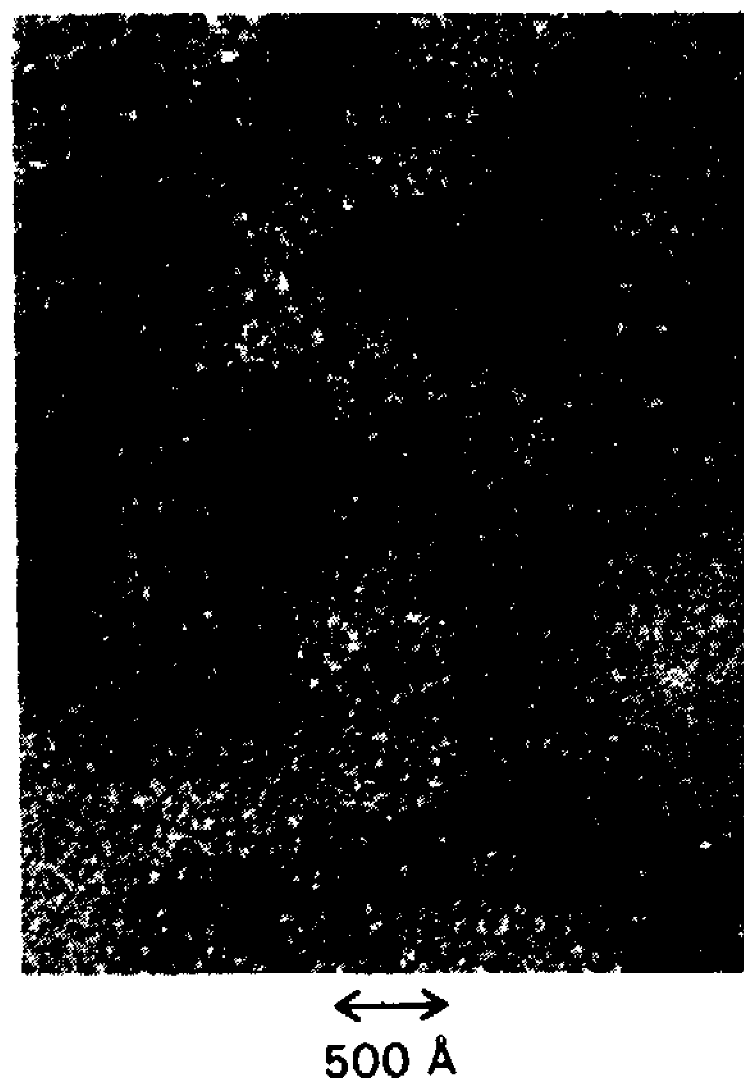
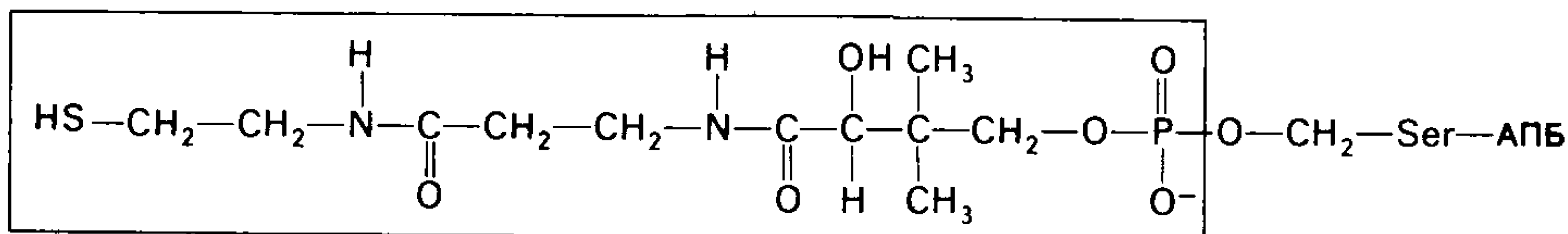


Рис. 17.10. Электронная микрофотография активной нитевидной формы ацетил-СоА-карбоксилазы из печени цыпленка. (Печатается с любезного разрешения д-ра M. Daniel Lane.)



Фосфопантетеиновая простетическая группа АПБ

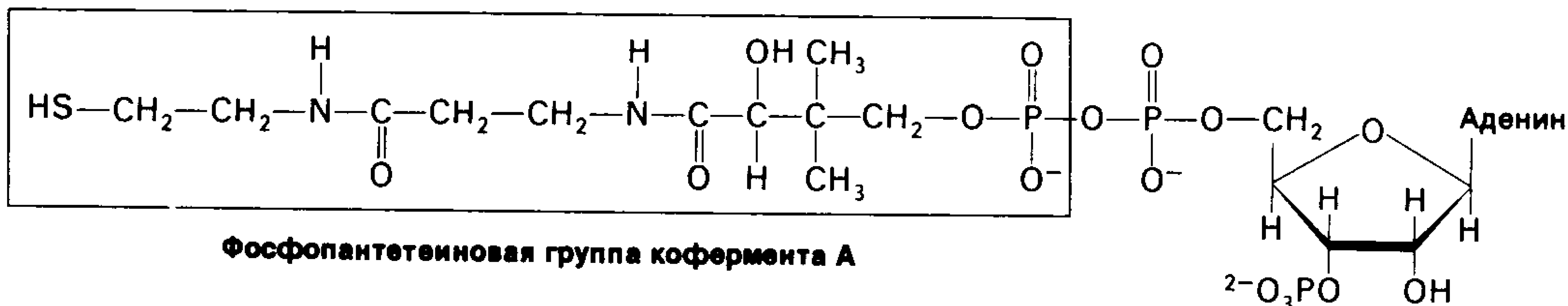


Рис. 17.11. Фосфопантетеин – реакционноспособный фрагмент АБП и СоА.

который сдвигает равновесие в сторону активной волокнистой формы фермента. Оптимальная ориентация биотина по отношению к субстратам достигается в волокнистой форме. В противоположность цитрату пальмитоил-СоА сдвигает равновесие в сторону неактивной протомерной формы. Таким образом, *пальмитоил-СоА, конечный продукт, ингибирует первый решающий этап в биосинтезе жирных кислот.* Регуляция ацетил-СоА – карбоксилазы у *E.coli* резко отличается от таковой у эукариот. У бактерий жирные кислоты являются прежде всего предшественниками фосфолипидов, а не резервным топливом, и поэтому контроль их синтеза носит другой характер. Цитрат не оказывает действия на ацетил-СоА – карбоксилазу *E.coli.* Активность транскарбоксилазного компонента системы регулируется гуаниновыми нуклеотидами, которые координируют синтез жирных кислот с ростом и делением бактерий.

17.17. Промежуточные продукты синтеза жирных кислот присоединены к ацилпереносящему белку

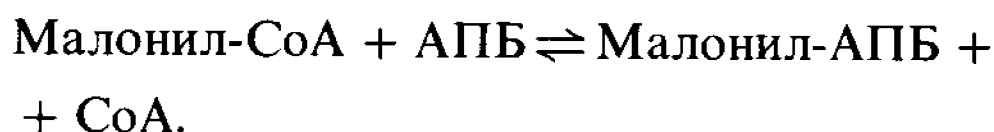
П. Рой Вагелос (P. Roy Vagelos) обнаружил, что промежуточные продукты синтеза жирных кислот связаны с ацилпереносящим белком (АПБ), а именно с сульфгидрильным концом фосфопантетеиновой группы (рис. 17.11). При расщеплении жирных кислот этот компонент является частью СоА, тогда как при их синтезе он связан с остатком серина в АПБ. Эту одиночную полипептидную цепь из 77 остатков можно рассматривать как гигантскую простетическую группу, «макро-СоА».

17.18. Цикл элонгации в синтезе жирных кислот

Ферментная система, катализирующая синтез насыщенных длинноцепочечных жирных кислот из ацетил-СоА, малонил-СоА и NADPH, называется *синтетазой жирных кислот.* У высших организмов она присутствует в виде мультиферментного комплекса. В отличие от этого у бактерий ферментные компоненты синтетаз жирных кислот бывают диссоциированы при разрушении клеток. Доступность этих изолированных ферментов облегчила изучение стадий синтеза жирных кислот (табл. 17.3). На самом деле реакции, обеспечивающие синтез жирных кислот у высших организмов, очень сходны с таковыми у бактерий.

Фаза элонгации в синтезе жирных кислот начинается с образования ацетил-АПБ и малонил-АПБ. Эти реакции катализируются *ацетил-трансацилазой* и *малонил-трансацилазой.*


Ацетил-СоА + АПБ ⇌ Ацетил-АПБ + СоА,


Малонил-СоА + АПБ ⇌ Малонил-АПБ + + СоА.

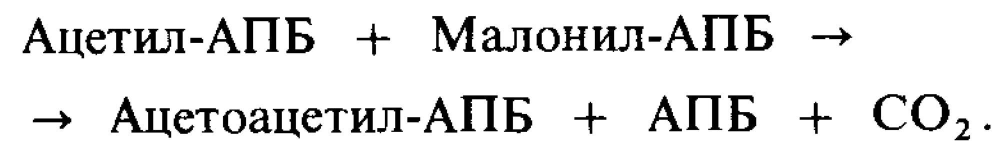
Малонил-трансацилаза высокоспецифична, тогда как ацетил-трансацилаза может переносить и ацильные группы, отличные от ацетильного компонента, хотя и со значительно меньшей скоростью. Жирные кислоты с нечетным числом углеродных ато-

Таблица 17.3. **Основные реакции в синтезе жирных кислот**

Стадия	Реакция	Фермент
1	Ацетил-CoA + HCO_3^- + ATP → Малонил-CoA + ADP + P_i + H^+	Ацетил-CoA—карбоксилаза
2	Ацетил-CoA + АПБ ⇌ Ацетил-АПБ + CoA	Ацетил-трансацилаза
3	Малонил-CoA + АПБ ⇌ Малонил-АПБ + CoA	Малонил-трансацилаза
4	Ацетил-АПБ + Малонил-АПБ → Ацетоацетил-АПБ + АПБ + CO_2	Ацилмалонил-АПБ-конденсирующий фермент
5	Ацетоацетил-АПБ + NADPH + H^+ ⇌ D-3-гидроксибутирил-АПБ + $NADP^+$	β-гидроксоацил-АПБ—редуктаза
6	D-3-гидроксибутирил-АПБ ⇌ Кротонил-АПБ + H_2O	3-гидроксиацил-АПБ—дегидратаза
7	Кротонил-АПБ + NADPH + H^+ → Бутирил-АПБ + $NADP^+$	Еноил-АПБ—редуктаза

мов синтезируются, начиная с пропионил-АПБ, который в свою очередь образуется из пропионил-CoA под действием ацетил-трансацетилазы.

Ацетил-АПБ и малонил-АПБ взаимодействуют с образованием ацетоацетил-АПБ. Эта реакция конденсации катализируется *ацил-малонил-АПБ-конденсирующим ферментом.*



$$\text{Ацетил-АПБ} + \text{Малонил-АПБ} \rightarrow \rightarrow \text{Ацетоацетил-АПБ} + \text{АПБ} + CO_2.$$

В приведенной реакции конденсации происходит образование четырехуглеродного компонента из двухуглеродного и трехуглеродного компонентов и высвобождается CO_2. Почему четырехуглеродный компонент образуется не из двух двухуглеродных фрагментов? Иными словами, почему в качестве реагентов выступают ацетил-АПБ и малонил-АПБ, а не две молекулы ацетил-АПБ? Ответ заключается в том, что равновесие реакции чрезвычайно неблагоприятно для синтеза ацетоацетил-АПБ из двух молекул ацетил-АПБ. Напротив, *равновесие реакции благоприятно для участия в этом синтезе малонил-АПБ, поскольку декарбоксилирование последнего приводит к существенному снижению свободной энергии.* В действительности, реакция конденсации запускается ATP, хотя ATP и не принимает в ней прямого участия, а используется для образования богатого энергией субстрата при карбоксилировании ацетил-CoA в малонил-CoA. Свободная энергия, запасенная в малонил-CoA в результате реакции карбоксилирования, высвобождается при декарбоксилировании, сопровождающем образование ацетоацетил-АПБ. Хотя HCO_3^- требуется для синтеза жирных кислот, его углеродный атом не появляется в образующемся продукте. *Все углеродные атомы жирных кислот, содержащих четное их количество, происходят из ацетил-CoA.*

Следующие три стадии синтеза жирных кислот состоят в восстановлении оксогруппы при С-3 в метиленовую группу (рис. 17.12). Сначала ацетоацетил-АПБ восстанавливается в D-3-гидроксибутирил-АПБ. Эта реакция отличается от соответствующей реакции при расщеплении жирных кислот двумя особенностями: 1) образуется преимущественно D-, а не L-эпимер и 2) восстанавливающим агентом служит NADPH, тогда как в качестве окисляющего агента при β-окислении используется NAD^+. Это различие иллюстрирует общий принцип, согласно которому *в реакциях биосинтеза расходуется NADPH, тогда как в результате энергодающих реакций происходит генерирование NADH.* Далее D-3-гидроксибутирил-АПБ *дегидратируется* с образованием кротонил-АПБ, представляющего собою *транс*-Δ^2-еноил-АПБ. Конечным этапом цикла является *восстановление* кротонил-АПБ в бутирил-АПБ. NADPH вновь играет роль восстановителя, тогда как в соответствующей реакции β-окисления окислителем служит FAD^+. В результате последних трех реакций – восстановления, дегидратирования и второго восстановления – происходит превращение ацетоацетил-АПБ в бутирил-АПБ, которое завершает первый цикл элонгации.

Во втором цикле синтеза жирных кислот бутирил-АПБ конденсируется с малонил-

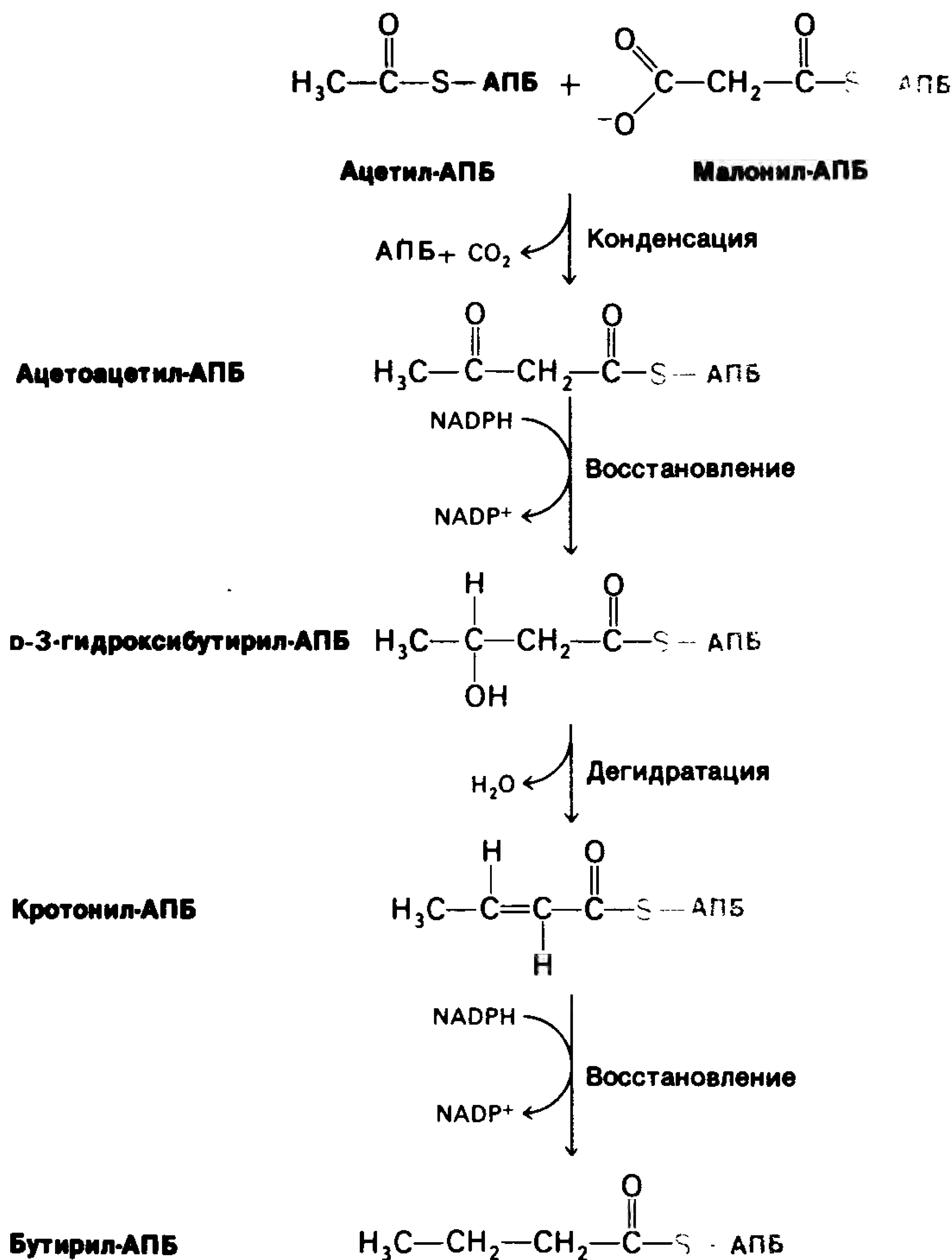
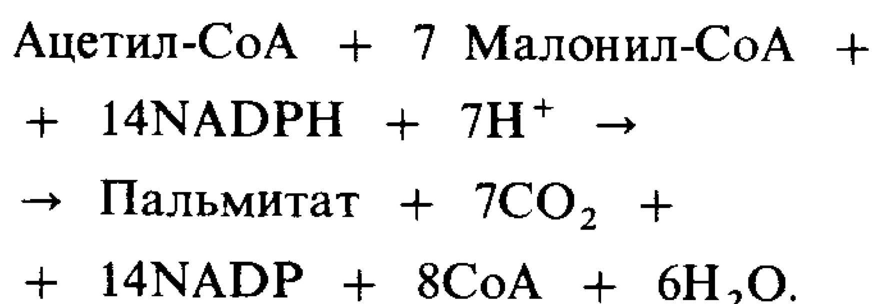


Рис. 17.12. Последовательность реакций в синтезе жирных кислот: конденсация, восстановление, дегидратация и восстановление. Указанные здесь промежуточные продукты образуются в первом цикле синтеза.

АПБ, давая C_6-β-оксоацил-АПБ. Эта реакция подобна конденсации ацетил-АПБ с малонил-АПБ в первом цикле, приводящей к образованию C_4-β-оксоацилАПБ. В результате восстановления, дегидратации и второго восстановления C_6-β-оксоацил-АПБ превращается в C_6-ацил-АПБ, который может вступать в третий цикл элонгации. Описанные циклы элонгации продолжаются вплоть до образования C_{16}-ацил-АПБ. Этот промежуточный продукт не может служить субстратом для конденсирующего фермента и гидролизуется с образованием пальмитата и АПБ.

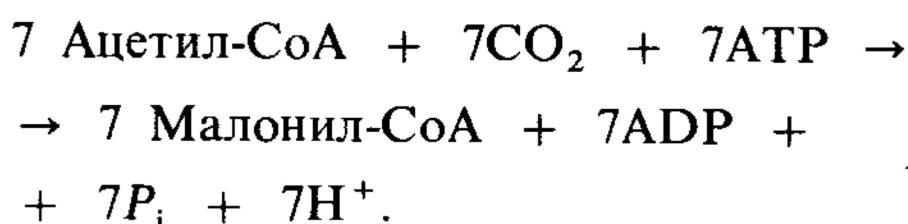
17.19. Стехиометрия синтеза жирных кислот

Приводим стехиометрию синтеза пальмитата:



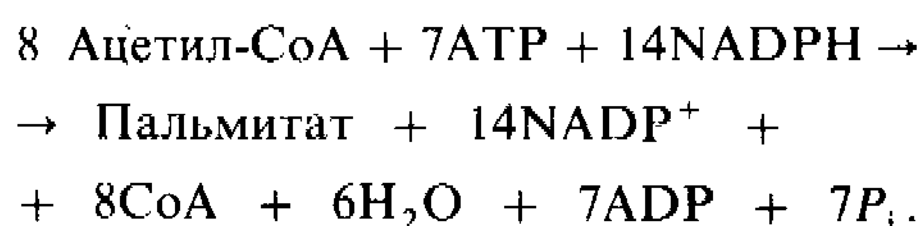
$$\text{Ацетил-CoA} + 7\ \text{Малонил-CoA} + 14\text{NADPH} + 7\text{H}^+ \rightarrow \text{Пальмитат} + 7\text{CO}_2 + 14\text{NADP} + 8\text{CoA} + 6\text{H}_2\text{O}.$$

При этом использовано следующее уравнение для синтеза малонил-CoA:



$$7\ \text{Ацетил-CoA} + 7\text{CO}_2 + 7\text{ATP} \rightarrow 7\ \text{Малонил-CoA} + 7\text{ADP} + 7P_i + 7\text{H}^+.$$

Отсюда выводим итоговую стехиометрию синтеза пальмитата:

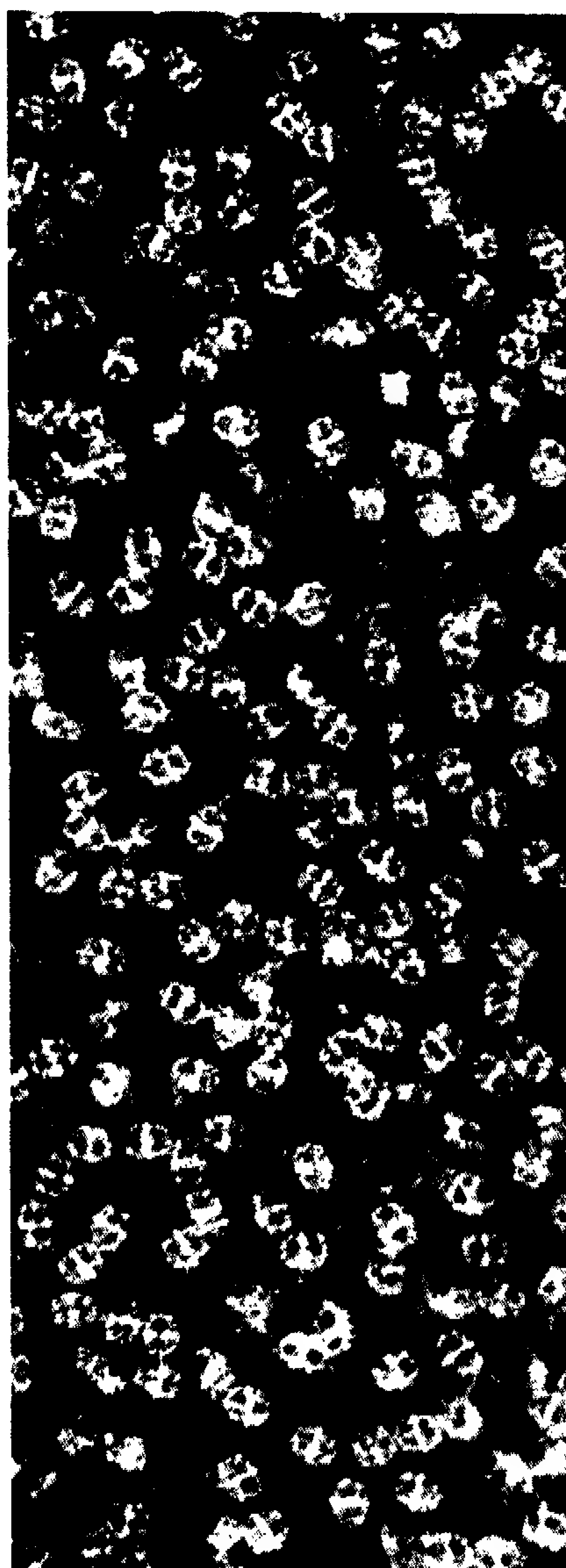


$$8\ \text{Ацетил-CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Пальмитат} + 14\text{NADP}^+ +$$
$$+ 8\text{CoA} + 6H_2O + 7\text{ADP} + 7P_i.$$

17.20. Жирные кислоты синтезируются у эукариот мультиферментным комплексом

Синтетазы жирных кислот у эукариот в отличие от таковых у бактерий представляют собою совершенно определенный мультиферментный комплекс. Комплекс, выделенный из дрожжей, обладает массой в 2300 кДа и на электронной микрофотографии имеет вид эллипсоида длиной 250 Å и поперечным диаметром 210 Å (рис. 17.13). *Он состоит только из двух видов полипептидных цепей, каждая из которых кодируется одним геном.* Субъединица А (185 кДа) содержит ацилпереносящий белок, конденсирующий фермент и β-оксоацил-редуктазу, тогда как субъединица В (175 кДа) содержит ацетил-трансацилазу, малонил-трансацилазу, β-гидроксиацил-дегидратазу и еноилредуктазу. Синтетаза жирных кислот у млекопитающих (400 кДа) также образована двумя видами субъединиц, подобных таковым у дрожжей. На самом деле, *многие мультиферментные комплексы эукариот состоят из полифункциональных белков, в которых различные ферменты ковалентно связаны в единую полипептидную цепь.* Преимущество такой организации - возможность координирования синтеза различных ферментов. Кроме того, мультиферментный комплекс, состоящий из ковалентно соединенных ферментов, является более стабильным, чем комплекс, образованный нековалентными связями.

Линен (Lynen) предположил, что удлиняющаяся цепь жирной кислоты переносится от АПБ к конденсирующему ферменту и обратно в каждом цикле элонгации. Первая *транслокация* освобождает место для транспортируемого малонильного компонента, вторая - происходит на стадии конденсации. Интересно отметить, что аналогичные транслокации имеют место при синтезе белков.



1000 Å

Рис. 17.13. Электронная микрофотография комплекса синтетазы жирных кислот из дрожжей. (Печатается с любезного разрешения д-ра Felix Wieland и д-ра Elmar A. Siess.)

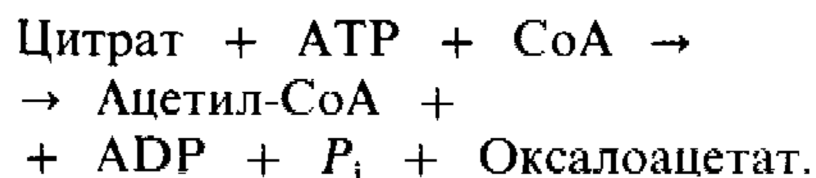
Гибкость и максимальная длина в 20 Å фосфопантетеинильного компонента представляются критическими для функции мультиферментного комплекса, поскольку они обеспечивают тесный контакт удлиняющейся цепи жирной кислоты с активным

Лиазы –
ферменты, катализирующие расщепление связей С—С, С—О или С—N путем элиминирования. В этих реакциях образуется двойная связь.

центром каждого фермента в комплексе. Для взаимодействия субъединиц фермента с субстратом не требуется их большой структурной перестройки, поскольку сам субстрат на длинном гибком плече может достигнуть каждого активного центра. Напомним, что биотин и липоамид в составе соответствующих мультиферментных комплексов также снабжены длинными гибкими плечами. Организованная структура синтетаз жирных кислот у дрожжей и высших организмов повышает общую эффективность процесса благодаря прямому переносу промежуточных продуктов от одного активного центра к следующему. Реагирующие соединения не разбавляются в цитозоле. Кроме того, им не нужно «находить» друг друга путем случайной диффузии. Еще одним преимуществом такого мультиферментного комплекса является то обстоятельство, что ковалентно связанные промежуточные продукты изолированы и защищены от конкурирующих реакций.

17.21. Цитрат переносит ацетильные группы для синтеза жирных кислот из митохондрий в цитозоль

Синтез пальмитата требует наличия 8 молекул ацетил-СоА, 14 NADPH и 7 ATP. Жирные кислоты синтезируются в цитозоле, тогда как ацетил-СоА образуется из пирувата в митохондриях. Следовательно, для синтеза жирных кислот необходимо, чтобы ацетил-СоА был перенесен из митохондрий в цитозоль. Однако митохондрии непроницаемы для ацетил-СоА. Напомним, что карнитин переносит только длинноцепочечные жирные кислоты. *Обход этого барьера для ацетил-СоА осуществляется при помощи цитрата, переносящего ацетильные группы через внутреннюю митохондриальную мембрану.* Цитрат образуется в митохондриальном матриксе путем конденсации ацетил-СоА и оксалоацетата. Затем он диффундирует в цитозоль, где расщепляется *цитрат-лиазой*:

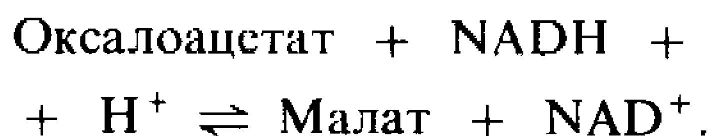


Цитрат + ATP + CoA →
→ Ацетил-СоА +
+ ADP + P_i + Оксалоацетат.

Таким образом, ацетил-СоА и оксалоацетат переносятся из митохондрий в цитозоль с использованием одной молекулы ATP.

17.22. Источники NADPH для синтеза жирных кислот

Оксалоацетат, образованный в результате переноса ацетильной группы в цитозоль, должен быть затем возвращен в митохондрии. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для оксалоацетата. Следовательно, необходимы реакции, идущие в обход этого препятствия. Очень важно, что в ходе этих реакций генерируется значительная часть NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот. Первая реакция состоит в восстановлении оксалоацетата до малата с участием NADH. Она происходит в цитозоле и катализируется *малат-дегидрогеназой*.



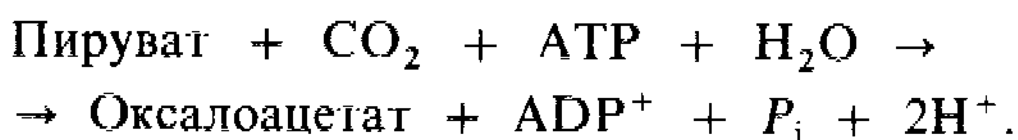
Оксалоацетат + NADH +
+ H^+ ⇌ Малат + NAD^+.

Вторая реакция – окислительное декарбоксилирование малата *$NADP^+$-зависимой малат-дегидрогеназой (декарбоксилирующей), называемой также «яблочным» ферментом.* С этой реакцией мы встречаемся впервые.



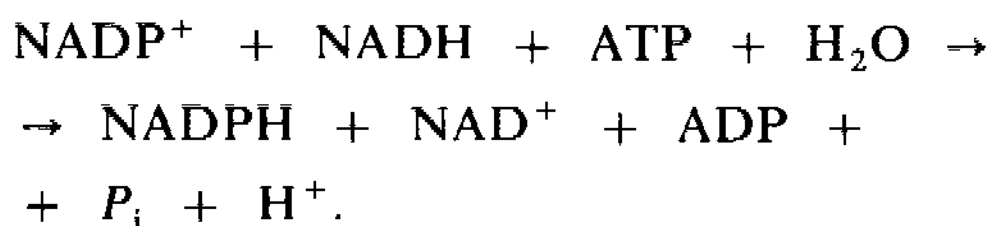
Малат + $NADP^+$ → Пируват +
+ CO_2 + NADPH.

Образовавшийся пируват легко диффундирует в митохондрии, где он карбоксилируется в оксалоацетат под действием пируват-карбоксилазы.



Пируват + CO_2 + ATP + H_2O →
→ Оксалоацетат + ADP^+ + P_i + $2H^+$.

Суммируя эти три реакции, получаем



$NADP^+$ + NADH + ATP + H_2O →
→ NADPH + NAD^+ + ADP +
+ P_i + H^+.

Таким образом, *на каждую молекулу ацетил-СоА, которая переходит из митохондрий в цитозоль, образуется одна молекула NADPH.* Следовательно, при переходе восьми молекул ацетил-СоА в цитозоль в про-

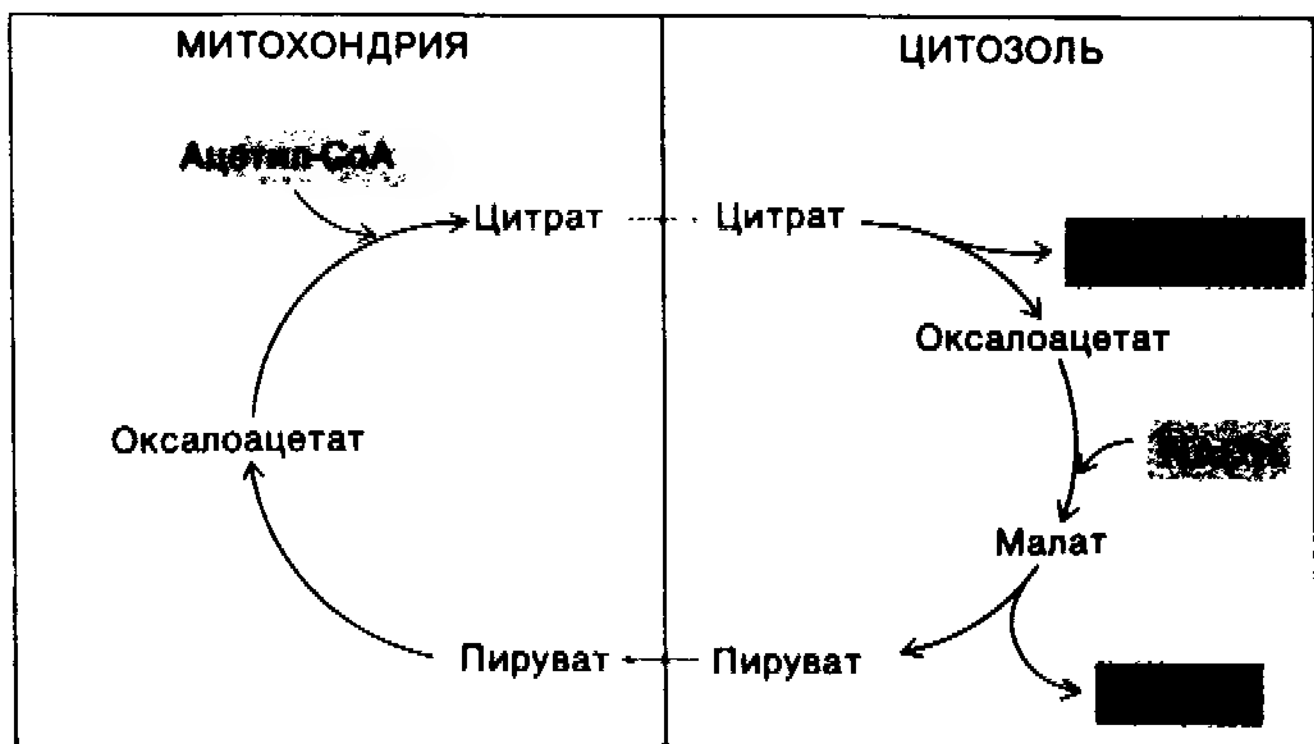
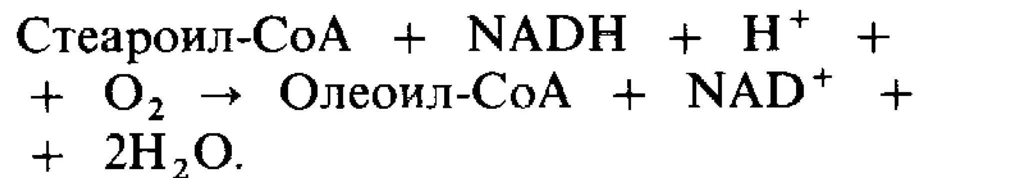


Рис. 17.14. Ацетил-CoA переносится из митохондрий в цитозоль при сопутствующем превращении NADH в NADPH в ходе указанной серии реакций.

цессе синтеза пальмитата образуются восемь NADPH. *Еще шесть NADPH, требующиеся для этого процесса, генерируются в пентозофосфатном пути.*

17.23. Элонгация и десатурация жирных кислот осуществляются добавочными ферментными системами

Основным продуктом реакции, катализируемой синтетазой жирных кислот, является пальмитат. У эукариот жирные кислоты с более длинной цепью образуются путем реакций элонгации, которые катализируются ферментными системами, связанными с *мембранами эндоплазматического ретикулума* (известными также как *микросомные системы*). Двухуглеродные фрагменты присоединяются к карбоксильному концу и насыщенных, и ненасыщенных жирных кислот. Микросомные системы катализируют также введение двойной связи в CoA-производные жирных кислот с длинной цепью. Например, при превращении стеароил-CoA в олеоил-CoA введение двойной *цис*-Δ^9-связи осуществляется оксидазой, использующей *молекулярный кислород* и *NADH* (или *NADPH*):



Стеароил-CoA + NADH + H^+ + O_2 → Олеоил-CoA + NAD^+ + $2H_2O$.

Из олеата в результате сочетания реакций элонгации и десатурации могут быть образованы различные ненасыщенные жирные кислоты. Например, олеат может быть удлинен до 20 : 1 *цис*-Δ^{11}-кислоты. Вместо этого возможно введение второй двойной связи с образованием 18 : 2 *цис*-Δ^6, Δ^9-кислоты. Точно так же пальмитат (16 : 0) может подвергнуться окислению до пальмитолеата (16 : 1 *цис*-Δ^9), который может далее быть удлинен до *цис*-вакцената (18 : 1 *цис*-Δ^{11}).

У млекопитающих нет ферментов, катализирующих введение двойных связей в цепь жирной кислоты далее 9-го углеродного атома. Поэтому у них не могут синтезироваться линолеат (18 : 2 *цис*-Δ^9, Δ^{12}) и линоленат (18 : 3 *цис*-Δ^9, Δ^{12}, Δ^{15}). *Линолеат и линоленат — две незаменимые жирные кислоты.* Термин «незаменимые» означает, что они необходимы организму, но не могут быть синтезированы эндогенно и поэтому должны поступать в него с пищей. Линолеат и линоленат, поступающие с пищей, служат исходными соединениями для синтеза ряда других ненасыщенных жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты у млекопитающих являются производными пальмитолеата (16 : 1), олеата (18 : 1), линолеата (18 : 2) или линолената (18 : 3). По числу метиленовых углеродов между ω-CH_3-группой ненасыщенной жирной кислоты и ближайшей двойной связью можно определить ее предшественника.

Предшественник	Формула
Линоленат	$CH_3—(CH_2)_1—CH{=}CH—R$
Линолеат	$CH_3—(CH_2)_4—CH{=}CH—R$
Пальмитолеат	$CH_3—(CH_2)_5—CH{=}CH—R$
Олеат	$CH_3—(CH_2)_7—CH{=}CH—R$

17.24. Регуляция синтеза жирных кислот

Синтез жирных кислот достигает максимального уровня в условиях избытка углеводов и низкого содержания жирных кислот. При этом большую роль играют как механизмы кратковременного контроля, так и механизмы долговременного контроля. Наиболее важным кратковременным регулятором синтеза жирных кислот является концентрация *цитрата* в цитозоле. Как уже упоминалось, цитрат стимулирует ацетил-CoA—карбоксилазу, фермент, катализирующий решающий этап в синтезе жирных кислот. Содержание цитрата находится на высоком уровне, когда и ацетил-CoA, и ATP присутствуют в избытке. Напомним, что изоцитрат-дегидрогеназа ингибируется высоким энергетическим зарядом (разд. 13.18). Следовательно, *высокое содержание цитрата говорит о доступности двухуглеродных фрагментов и ATP для синтеза жирных кислот. Пальмитоил-CoA*, который накапливается при избытке жирных кислот, является антагонистом цитрата в его действии на ацетил-CoA-карбоксилазу. Кроме того, пальмитоил-CoA подавляет функцию переносчика, осуществляющего транспорт цитрата из митохондрий в цитозоль, а также ингибирует генерирование NADPH под действием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы.

Долговременная регуляция опосредуется изменениями скорости синтеза и деградации ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот. Этот тип регуляции известен также как *адаптивный контроль*. У животных, получающих в течение нескольких дней после голодания богатую углеводами и бедную жиром диету, наблюдается резкое увеличение количества ацетил-CoA-карбоксилазы и синтетазы жирных кислот в печени.

Заключение

Жирные кислоты играют важную физиологическую роль и в качестве компонентов фосфолипидов и гликолипидов и в качестве молекул, выполняющих функцию топлива. Они запасаются в жировой ткани в виде триацилглицеролов (нейтрального жира), которые могут быть мобилизованы под действием липаз, находящихся под гормональным контролем. Жирные кислоты активируются, превращаясь в ацил-CoA, переносятся с помощью карнитина через внутреннюю митохондриальную мембрану и расщепляются в митохондриальном матриксе в результате повторяющейся последовательности четырех реакций: 1) окисления, зависимого от FAD, 2) гидратации, 3) окисления, зависимого от NAD^+, и 4) тиолиза с участием CoA. $FADH_2$ и NADH, образовавшиеся на окислительных стадиях, передают свои электроны на O_2 через дыхательную цепь, тогда как ацетил-CoA, образовавшийся на стадии тиолиза, в норме включается в цикл трикарбоновых кислот, конденсируясь с оксалоацетатом. Если концентрация оксалоацетата недостаточно высока, образование ацетил-CoA сопровождается повышением содержания ацетоацетата и 3-гидроксибутирата, играющих в норме роль топливных молекул. При голодании и при диабете в крови накапливаются большие количества ацетоацетата, 3-гидроксибутирата и ацетона (называемых в совокупности кетоновыми телами). Млекопитающие неспособны превращать жирные кислоты в глюкозу, потому что у них нет такого метаболического пути, который бы обеспечивал образование оксалоацетата, пирувата или других промежуточных продуктов гликолиза из ацетил-CoA.

Синтез жирных кислот в цитозоле осуществляется в результате реакций, отличных от реакций β-окисления. Он начинается с карбоксилирования ацетил-CoA в малонил-CoA. Данная реакция, запускаемая ATP, катализируется биотиновым ферментом ацетил-CoA—карбоксилазой. Этот решающий этап в биосинтезе жирных кислот аллостерически стимулируется цитратом. Промежуточные продукты синтеза жирных кислот связаны с ацилпереносящим белком (АПБ), а именно с сульфидным концом его фосфопантетеиновой простетической группы. Ацетил-АПБ образуется из ацетил-CoA, малонил-АПБ-из малонил-CoA. Ацетил-АПБ и малонил-АПБ конденсируются с образованием ацетоацетил-АПБ в результате реакции, запускаемой высвобождением CO_2 из активированного малонильного компонента. Далее следуют реакции восстановления, дегидратации и повторного восстановления. Восстановителем на этих стадиях служит NADPH. Образовавшийся указанным путем бутирил-АПБ может вступить во второй цикл элонгации, начинающийся с присоединения двухуглеродного компонента из малонил-АПБ. Семь циклов элонгации приводят к образованию пальмитоил-АПБ, который гидроли-

зуется до пальмитата. Синтез пальмитата требует восьми молекул ацетил-CoA, четырнадцати NADPH и семи ATP. У высших организмов ферменты, осуществляющие синтез жирных кислот, организованы в мультиферментный комплекс. Два типа полипептидных цепей в этих комплексах содержат семь ковалентно связанных ферментов. Цикл реакций, основанный на распаде цитрата, осуществляет перенос ацетильных групп из митохондрий в цитозоль и генерирование части требующегося NADPH. Остальной NADPH образуется в ходе пентозофосфатного пути. Элонгация и десатурация жирных кислот катализируются ферментными системами мембран эндоплазматического ретикулума. У млекопитающих отсутствуют ферменты, вводящие двойные связи дистальнее C-9, и поэтому они должны получать линолеат и линоленат с пищей.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Lynen F., 1972. The pathway from "activated acetic acid" to the terpenes and fatty acids. In: Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963–1970), pp. 103–138, American Elsevier (1973). (Анализ пионерской работы автора по распаду и синтезу жирных кислот и роли в этих процессах ацетил-CoA и биотина.)

Общие обзоры

Wakil S.J., Barnes E.M., Jr., 1971. Fatty acid metabolism, Compr. Biochem., **18S**, 57–104.

Newsholme E.A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism, Wiley. (В гл. 4 и 7 рассматривается регуляция жирового обмена.)

Окисление жирных кислот

McGarry J.D., Foster D.W., 1980. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production, Ann. Rev. Biochem., **49**, 395–420.

Bressler R., 1970. Fatty acid oxidation, Compr. Biochem., **18**, 331–359.

Garland P.B., Shepherd D., Nicholls D.G., Yates D.W., Light P.A., 1969. Interactions between fatty acid oxidation and the tricarboxylic acid cycle. In: Lowenstein J.M. (ed.), Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation, pp. 163–212, Dekker.

Карнитин

Bremer J., 1977. Carnitine and its role in fatty acid metabolism, Trends Biochem. Sci., **2**, 207–209.

Fritz I.B., 1968. The metabolic consequences of the effects of carnitine on long-chain fatty acid oxidation. In: Gran F.C. (ed.), Symposium on Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism, pp. 39–63, Academic Press.

Engel W.K., Vick N.A., Glueck C.J., Levy R.L., 1970. A skeletal-muscle disorder associated with intermittent symptoms and a possible defect of lipid metabolism, N. Engl. J. Med., **282**, 697–704.

Синтез жирных кислот

Volpe J.J., Vagelos P.R., 1976. Mechanism and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids, Physiol. Rev., **56**, 339–417.

Bloch K., Vance D., 1977. Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids, Ann. Rev. Biochem., **46**, 263–298.

Lynen F., 1972. Enzyme systems for fatty acid synthesis, Biochem. Soc. Symp., **35**, 5–26.

Lane M.D., Moss J., Polakis S.E., 1974. Acetyl coenzyme A carboxylase, Curr. Top. Cell Regul., **8**, 130–187.

Numa S., Yamashita S., 1974. Regulation of lipogenesis in animal tissues, Curr. Top. Cell Regul., **8**, 197–239.

Utter M.F., 1969. Metabolic roles of oxaloacetate. In: Lowenstein J.M. (ed.), Citric Acid Cycle: Control and Compartmentation, pp. 249–296. (Включает обсуждение роли оксалоацетата в транспорте ацетильных групп в цитозоль для синтеза жирных кислот.)

Механизмы ферментативных реакций

Wood H.G., Barden R.E., 1977. Biotin enzymes, Ann. Rev. Biochem., **46**, 385–413.

Alberts A.W., Vagelos P.R., 1972. Acyl-CoA carboxylases. In: Boyer P.D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 6, pp. 37–82, Academic Press.

Vagelos P.R., 1973. Acyl group transfer (acyl carrier protein). In: Boyer P.D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 8, pp. 155–199.

Вопросы и задачи

1. Напишите уравнение равновесного состояния для превращения глицерола в пируват. Какие при этом требуются ферменты помимо ферментов гликолитического пути?

2. Напишите уравнение равновесного состояния для превращения стеарата в ацетоацетат.

3. Сравните следующие характеристики окисления и синтеза жирных кислот:
а) локализация процесса;
б) переносчик ацильных групп;
в) восстановители и окислители;
г) стереохимия промежуточных продуктов;
д) направление синтеза или распада;
е) организация ферментной системы.

4. Для каждой из следующих ненасыщенных жирных кислот укажите, является ли ее биосинтетическим предшественником у животных пальмито-

леат, олеат, линолеат или линоленат.

а) 18 : 1 *цис*-Δ^{11};

б) 18 : 3 цис-Δ^{6}, Δ^{9}, Δ^{12};

в) 20 : 2 *цис*-Δ^{11}, Δ^{14};

г) 20 : 3 *цис*-Δ^{5}, Δ^{8}, Δ^{11};

д) 22 : 1 *цис*-Δ^{13};

е) 22 : 6 *цис*-Δ^{14}, Δ^{7}, Δ^{10}, Δ^{13}, Δ^{16}, Δ^{19}.

5. Рассмотрим клеточный экстракт, активно синтезирующий пальмитат. Примем, что синтетаза жирных кислот в этом препарате синтезирует одну молекулу пальмитата примерно за пять минут. К системе быстро добавляют большое количество малонил-СоА, в котором все углеродные атомы малонильного компонента мечены ^{14}C, и синтез жирных кислот прекращают через одну минуту изменением pH. Определяют радиоактивность жирных кислот надосадочной фракции. Какой углеродный атом пальмитата, образованного этой системой, обладает большей радиоактивностью – С-1 или С-14?

6. У некоторых растений и микроорганизмов цикл трикарбоновых кислот модифицирован. У них содержатся два фермента, отсутствующие у животных,– изоцитраза (изоцитрат-лиаза) и малат-синтаза. Изоцитраза катализирует альдольное расщепление изоцитрата до сукцината и глиоксилата ($OHC—COO^-$), а малат-синтаза катализирует образование малата из ацетил-СоА, глиоксилата и воды.

а) Может ли происходить у этих организмов образование оксалоацетата из ацетил-СоА при отсутствии изоцитрат-дегидрогеназы и наличии малат-дегидрогеназы? Если да, напишите уравнение равновесного состояния для этого превращения.

б) Могут ли эти организмы синтезировать глюкозу из ацетил-СоА?

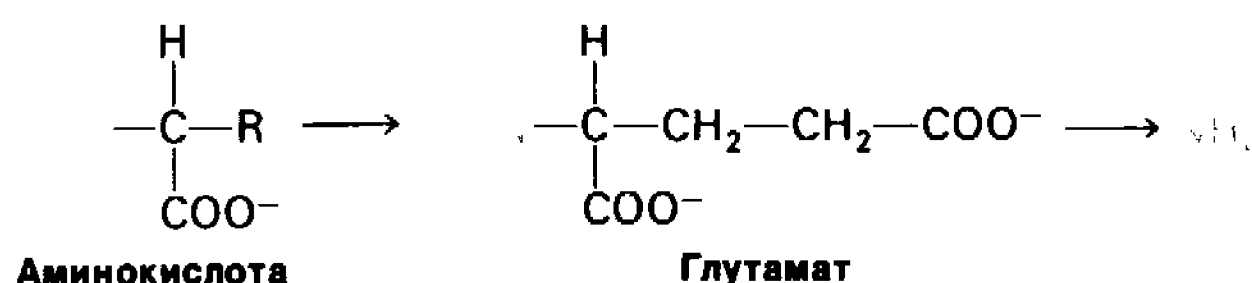
ГЛАВА 18

Разрушение аминокислот и цикл мочевины

Избыток аминокислот относительно того их количества, которое требуется для синтеза белков и других биомолекул, в отличие от жирных кислот и глюкозы не может запасаться и не выделяется из организма. Избыточные аминокислоты используются как метаболическое топливо. *α-Аминогруппа при этом отделяется, а остающийся углеродный скелет превращается в основные промежуточные продукты обмена веществ.* Большинство аминогрупп избыточных аминокислот расходуется на образование мочевины, тогда как их углеродные скелеты трансформируются в ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, пируват или один из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот. Следовательно, *жирные кислоты, кетоновые тела и глюкоза могут быть образованы из аминокислот.*

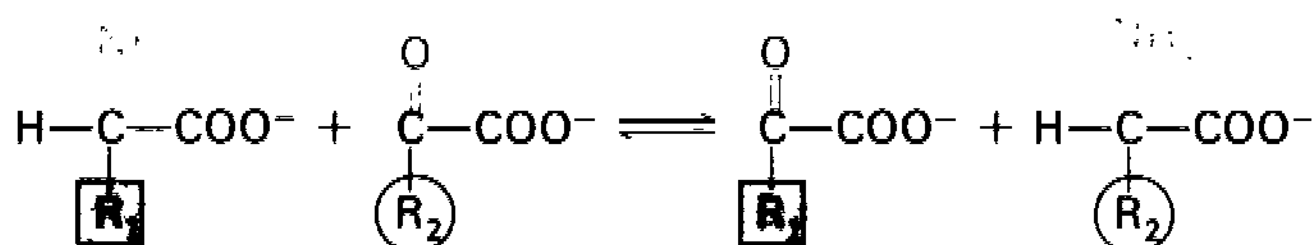
18.1. α-Аминогруппы превращаются в ион аммония при окислительном дезаминировании глутамата

У млекопитающих аминокислоты разрушаются в основном в печени. Сначала мы рассмотрим судьбу α-аминогруппы, затем – судьбу углеродного скелета. α-Аминогруппа большинства аминокислот переносится на α-оксоглутарат с образованием *глутамата*, который подвергается далее окислительному дезаминированию с образованием NH_4.



Аминокислота **Глутамат**

Перенос α-аминогруппы от α-аминокислоты на α-оксокислоту катализируется *аминотрансферазами*, называемыми также *трансаминазами*.



Глутамат-аминотрансфераза, наиболее важный из этих ферментов, катализирует перенос аминогруппы на α-оксоглутарат.

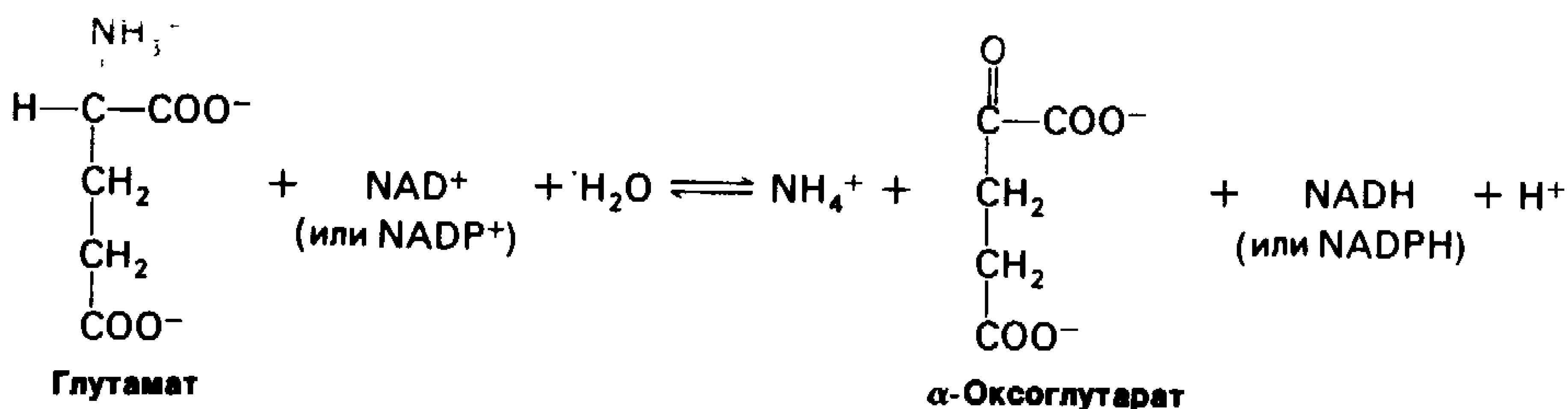
α-Аминокислота + α-Оксоглутарат ⇌ α-Оксокислота + Глутамат.

Аланин-аминотрансфераза, также преобладающая в тканях млекопитающих, катализирует перенос аминогруппы на пируват.

α-Аминокислота + Пируват ⇌ α-Оксокислота + Аланин.

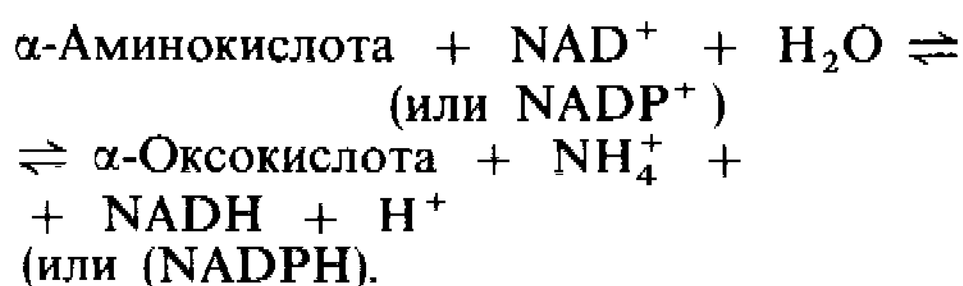
Образовавшийся при этом аланин может передавать свою аминогруппу на α-оксоглутарат с образованием глутамата. *Две названные аминотрансферазы играют роль своего рода «воронок», направляющих аминогруппы от различных аминокислот в глутамат для последующего превращения в NH_4.*

Ион аммония образуется из глутамата путем окислительного дезаминирования. Реакция катализируется глутамат-дегидрогеназой, которая обладает необычной способностью использовать как NAD^+, так и $NADP^+$.

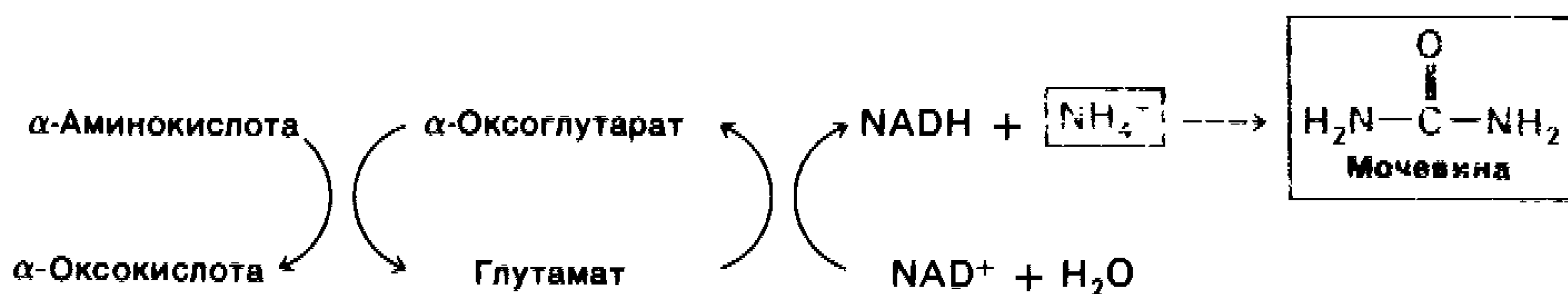


Активность глутамат-дегидрогеназы регулируется аллостерически. Фермент позвоночных состоит из шести идентичных субъединиц, способных к дальнейшей полимеризации. Гуанозинтрифосфат (GTP) и аденозинтрифосфат (ATP) являются аллостерическими ингибиторами, тогда как гуанозиндифосфат (GDP) и аденозиндифосфат (ADP) служат аллостерическими активаторами. Следовательно, *снижение энергетического заряда ускоряет окисление аминокислот.*

Превращения, катализируемые аминотрансферазами и глутамат-дегидрогеназой, описываются следующей суммарной реакцией:



α-Аминокислота + NAD^+ + H_2O ⇌
(или $NADP^+$)
⇌ α-Оксокислота + NH_4^+ +
+ NADH + H^+
(или (NADPH).

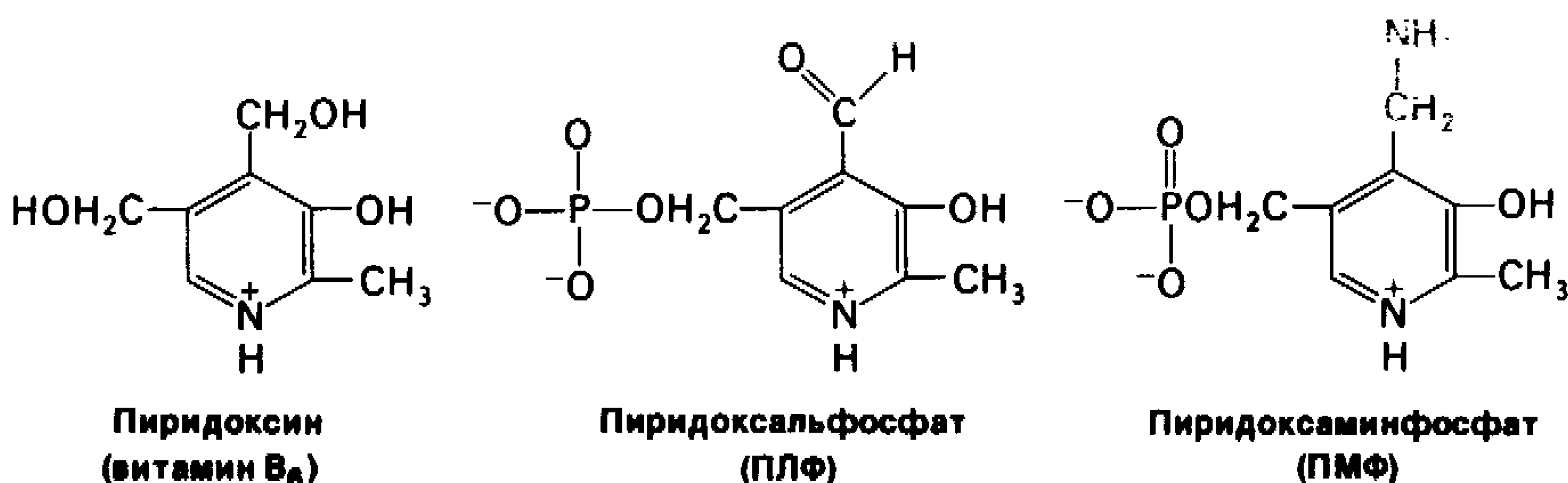


У сухопутных позвоночных NH_4^+ превращается в мочевину, которая затем выделяется с мочой. Синтез мочевины мы рассмотрим в дальнейшем.

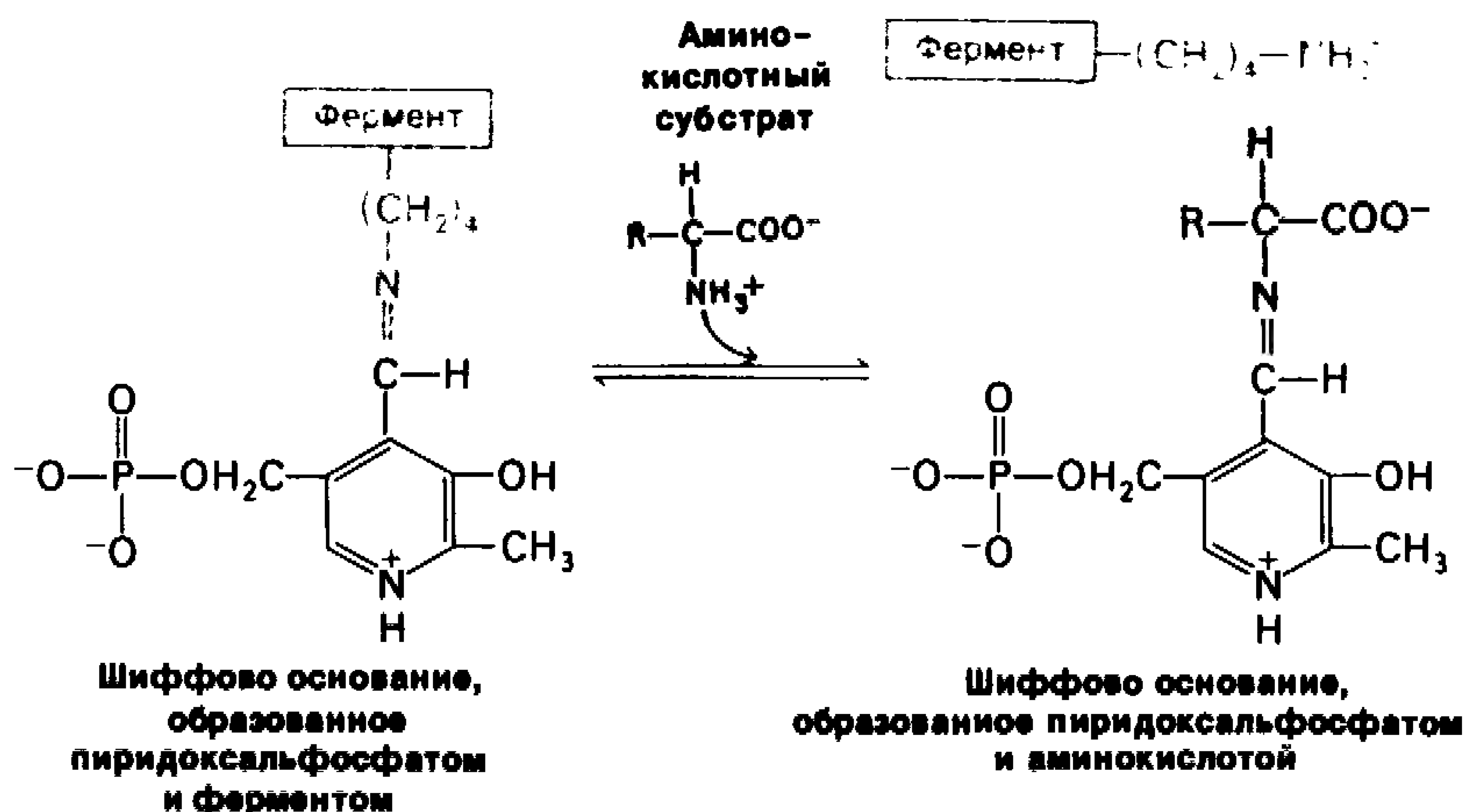
18.2. Пиридоксальфасфат, простетическая группа аминотрансфераз, образует в качестве промежуточных продуктов шиффовы основания

Простетической группой всех аминотрансфераз служит *пиридоксальфосфат* (ПЛФ), являющийся производным *пиридоксина* (витамина B_6). В процессе трансаминирования происходит временное превращение пиридоксальфосфата в *пиридоксаминфосфат* (ПМФ).

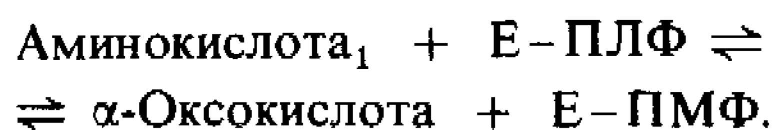
ПЛФ-ферменты образуют с субстратами в качестве промежуточных продуктов шиффовы основания. В отсутствие субстрата альдегидная группа пиридоксальфосфата связана в шиффовом основании с *ε-аминогруппой специфического остатка лизина в активном центре.* При добавлении аминокислотного субстрата образуется новое шиффово основание. *α-Аминогруппа аминокислотного субстрата замещает в активном центре ε-NH_2-группу лизина.* Образующееся шиффово основание между аминокислотой и пиридоксальфосфатом остается прочно связанным с ферментом нековалентными связями.



Пиридоксин (витамин B_6) Пиридоксальфосфат (ПЛФ) Пиридоксаминфосфат (ПМФ)

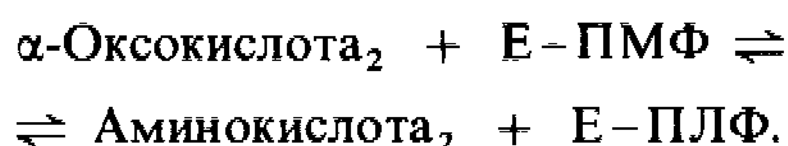


Это шиффово основание и шиффово основание между пиридоксальфосфатом и лизином активного центра представляют собою *альдимины*. В ходе катализа изменяется положение двойной связи в шиффовом основании между аминокислотой и пиридоксальфосфатом и образуется *кетимин*, который далее гидролизуется на *пиридоксаминфосфат* и *α-оксокислоту*. Механизм реакции, предложенный Эсмондом Снеллом (Esmond Snell) и Александром Браунштейном, показан на рис. 18.2. Лизин активного центра или другая основная группа, занимающая соответствующее положение, вероятно, облегчает превращение альдимина в кетимин, выполняя функцию улавливателя электронов. Эти превращения составляют половину суммарной реакции:



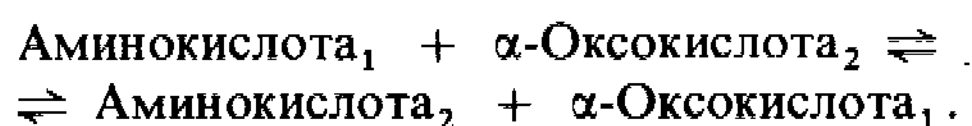
$$\text{Аминокислота}_1 + \text{Е–ПЛФ} \rightleftharpoons \text{α-Оксокислота} + \text{Е–ПМФ}.$$

Вторая половина суммарной реакции состоит в обращении вышеуказанного пути. Вторая α-оксокислота реагирует с комплексом фермент – пиридоксаминфосфат (Е – ПМФ), что приводит к образованию второй аминокислоты и регенерированию комплекса фермент – пиридоксальфосфат (Е – ПЛФ).



$$\text{α-Оксокислота}_2 + \text{Е–ПМФ} \rightleftharpoons \text{Аминокислота}_2 + \text{Е–ПЛФ}.$$

Суммарное уравнение этих частичных реакций имеет следующий вид:



$$\text{Аминокислота}_1 + \text{α-Оксокислота}_2 \rightleftharpoons \text{Аминокислота}_2 + \text{α-Оксокислота}_1.$$

Каталитическое многообразие ферментов, содержащих в качестве простетической группы пиридоксальфосфат, замечательно. Трансаминирование – как раз одно из многих превращений аминокислот, катализируемых этими ферментами. Другие реакции с участием α-углеродного атома аминокислот представлены процессами декарбоксилирования, дезаминирования, рацемизации и альдольного расщепления (рис. 18.3). Кроме того, пиридоксальфосфатные ферменты катализируют реакции элиминирования и замещения при β-углеродном атоме (например, триптофан-синтаза; разд. 21.9) и γ-углеродном атоме (например, цистатионаза; разд. 21.8) аминокислотных субстратов. Все эти реакции имеют следующие общие черты. Во-первых, происходит образование *шиффова основания* между аминокислотным субстратом (аминный компонент) и пиридоксальфосфатом (карбонильный компонент). Во-вторых, ПЛФ действует как *улавливатель электронов*, стабилизируя отрицательно заряженные промежуточные продукты каталитического процесса. Азот в кольце ПЛФ «притягивает» электроны из аминокислотного субстрата. Иными словами, ПЛФ представляет собою *электрофильный катализатор*. В-третьих, образовавшееся шиффово основание далее подвергается гидролизу.

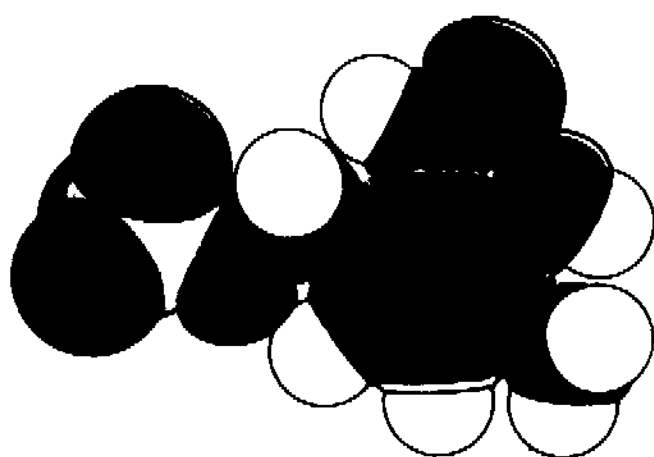


Рис. 18.1. Пространственная модель пиридоксальфосфата.

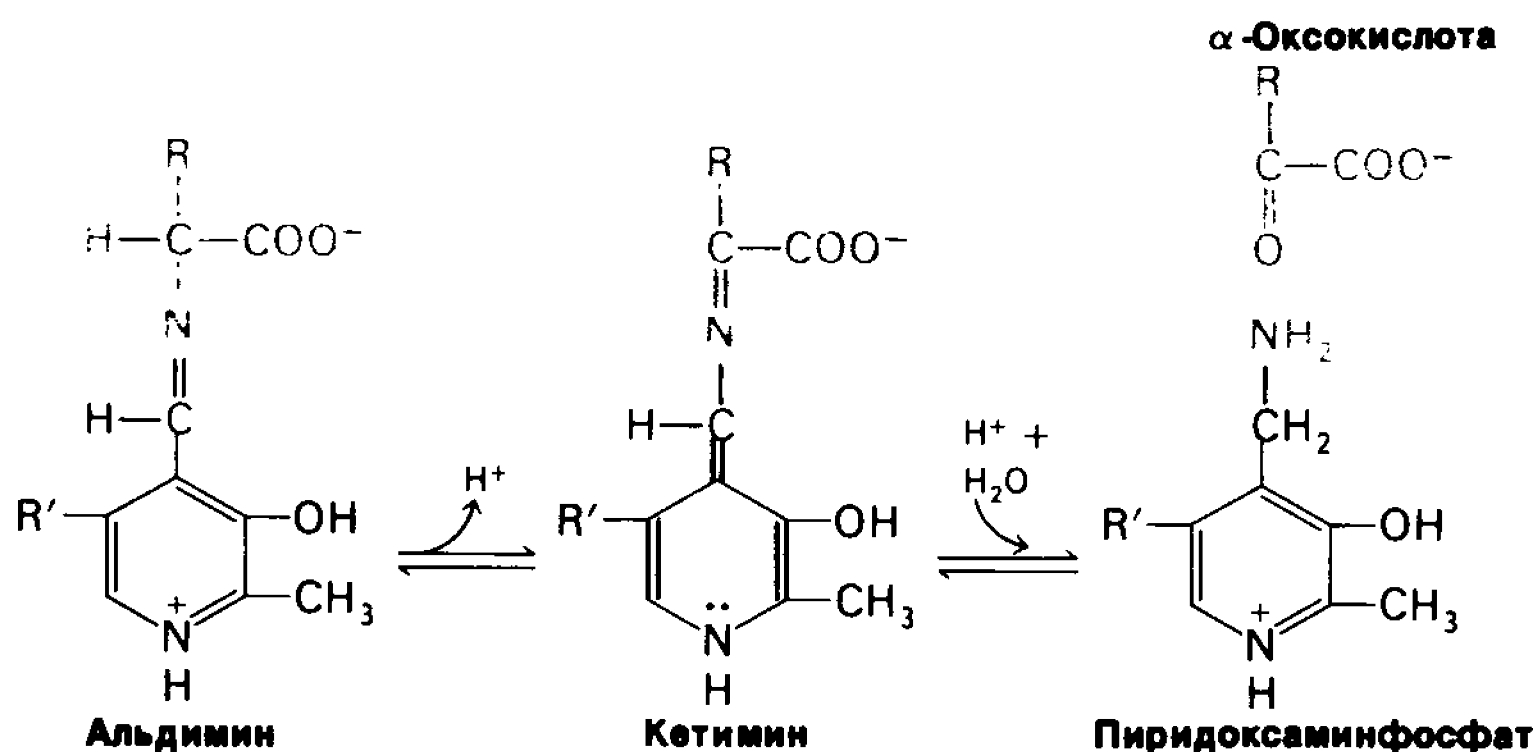


Рис. 18.2. Предложенный механизм для реакций трансаминирования.

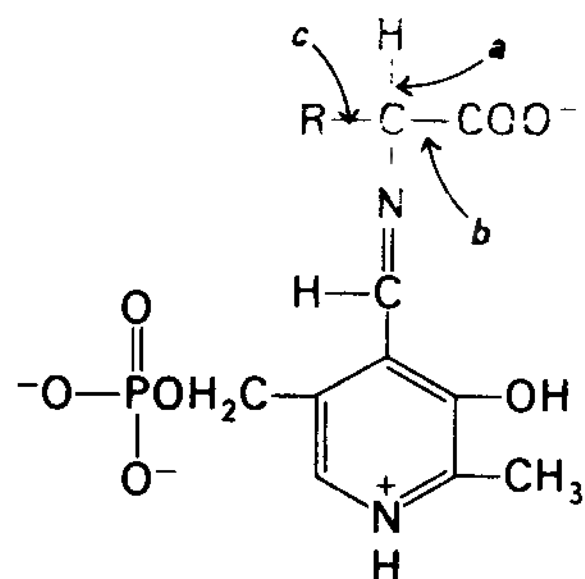


Рис. 18.3. Пиридоксальфосфатные ферменты лабилизируют одну из трех связей при α-углеродном атоме аминокислотного субстрата. Например, связь *a* лабилизируется трансаминазами, связь *b* – декарбоксилазами и связь *c* – альдолазами (такими, как треонин-альдолаза). Пиридоксальфосфатные ферменты катализируют также реакции при β- и γ-углеродных атомах аминокислот.

18.3. Серин и треонин могут дезаминироваться непосредственно

α-Аминогруппы серина и треонина могут непосредственно превращаться в NH_4, потому что в боковой цепи каждой из этих аминокислот имеется гидроксильная группа. Эти реакции прямого дезаминирования катализируются *серин-дегидратазой* и *треонин-дегидратазой*, простетической группой которых служит ПЛФ.

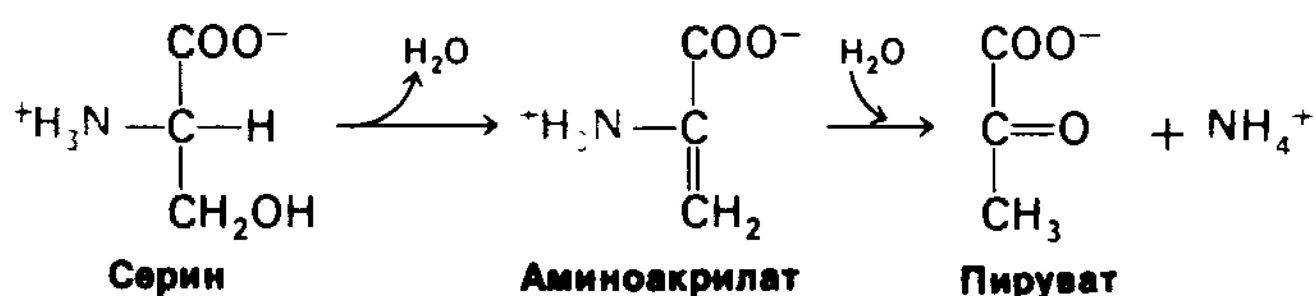
Серин + Пируват + NH_4^+,

Треонин → α-Оксобутират + NH_4^+.

Указанные ферменты названы дегидратазами, поскольку в катализируемых ими реакциях дезаминированию предшествует дегидратация. Серин теряет атом водорода при α-углероде и гидроксильную группу при β-углероде с образованием аминоакрилата. Это нестойкое соединение реагирует с H_2O, давая пируват и NH_4^+.

18.4. У большинства наземных позвоночных NH_4^+ превращается в мочевину и в таком виде экскретируется

Часть NH_4^+, образовавшегося при разрушении аминокислот, расходуется на биосинтез азотистых соединений. У большинства наземных позвоночных избыток NH_4^+ превращается в мочевину и в таком виде выделяется из организма. У птиц и наземных пресмыкающихся NH_4^+ превращается в мочевую кислоту, которая и выделяется из организма, тогда как у многих водных животных он экскретируется как таковой. Эти



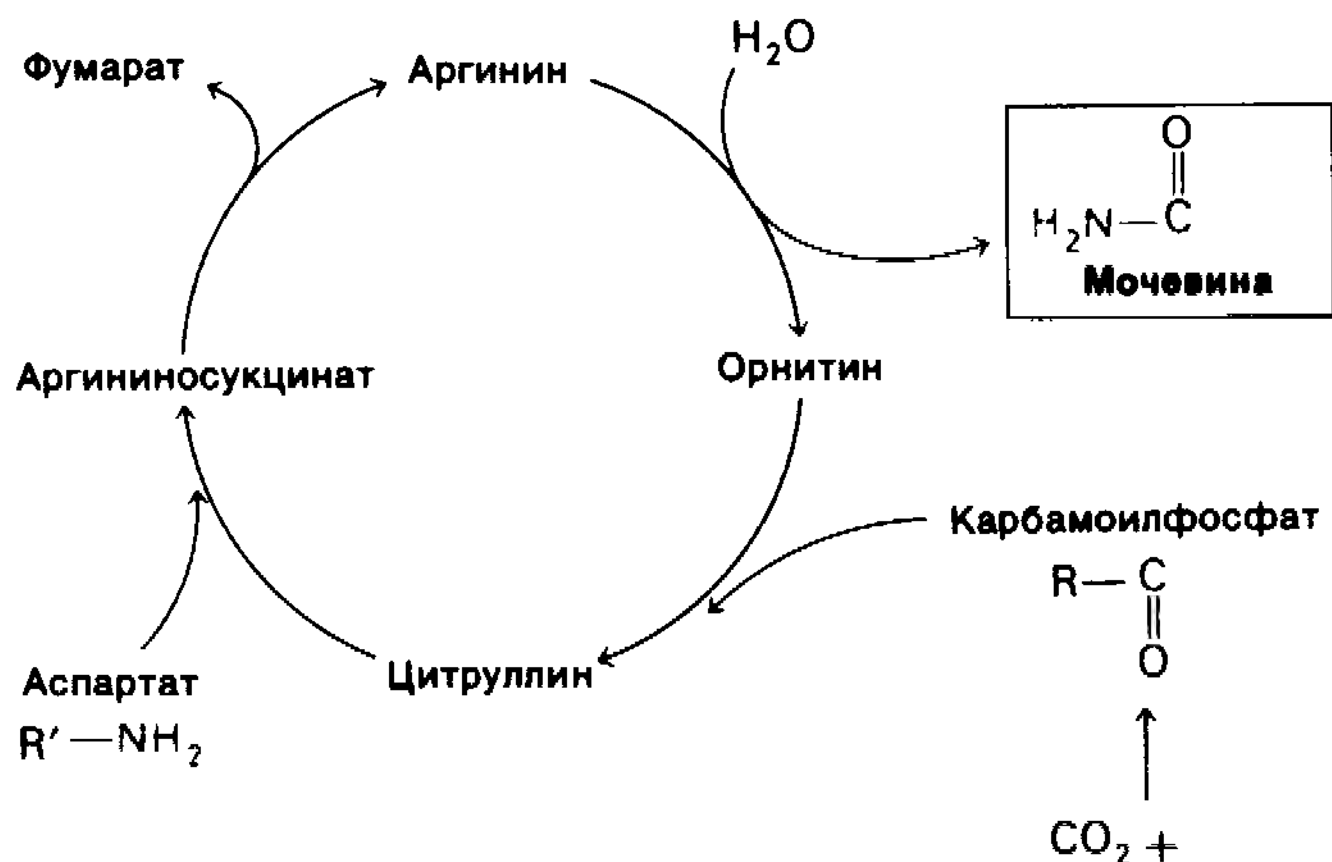
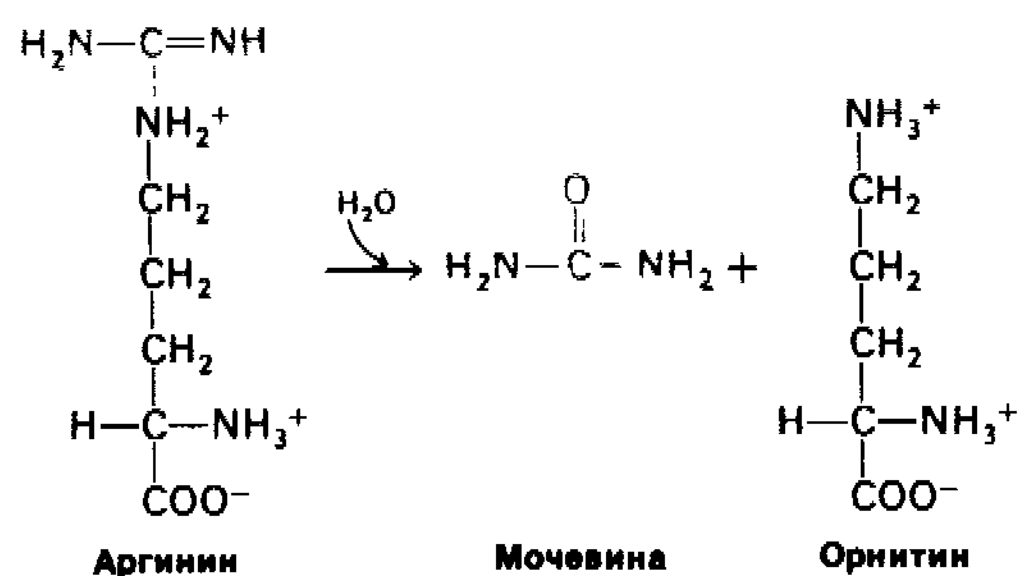


Рис. 18.4. Цикл мочевины.

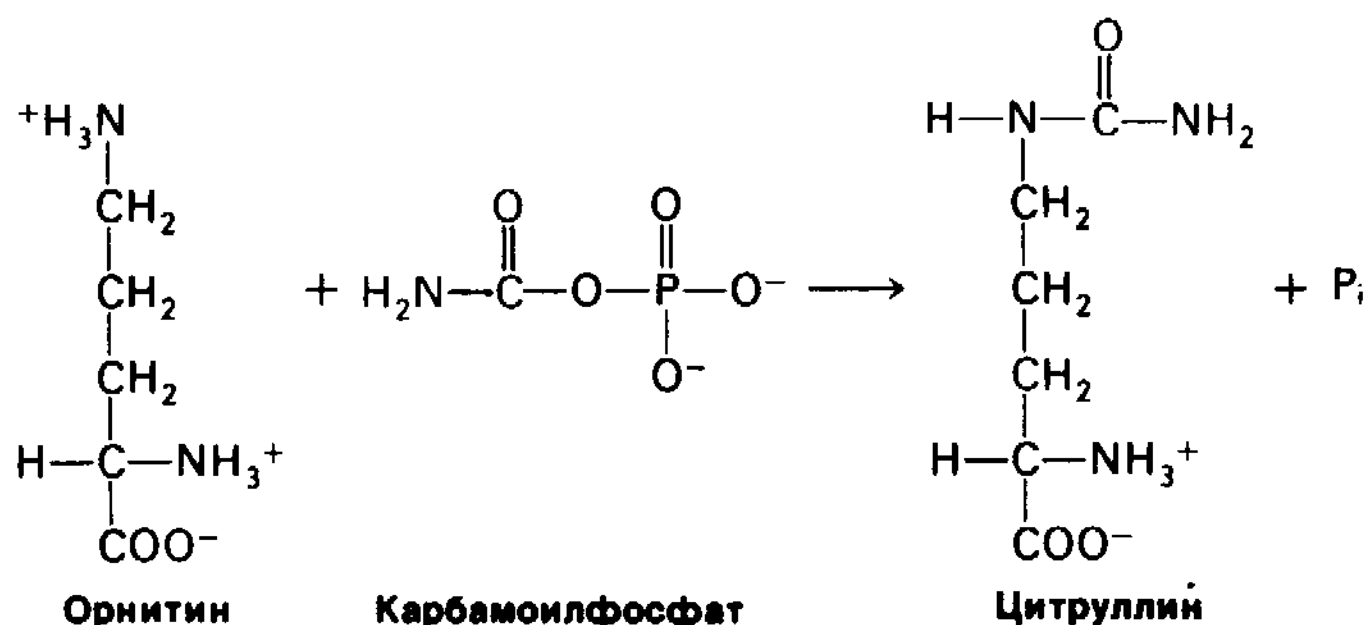


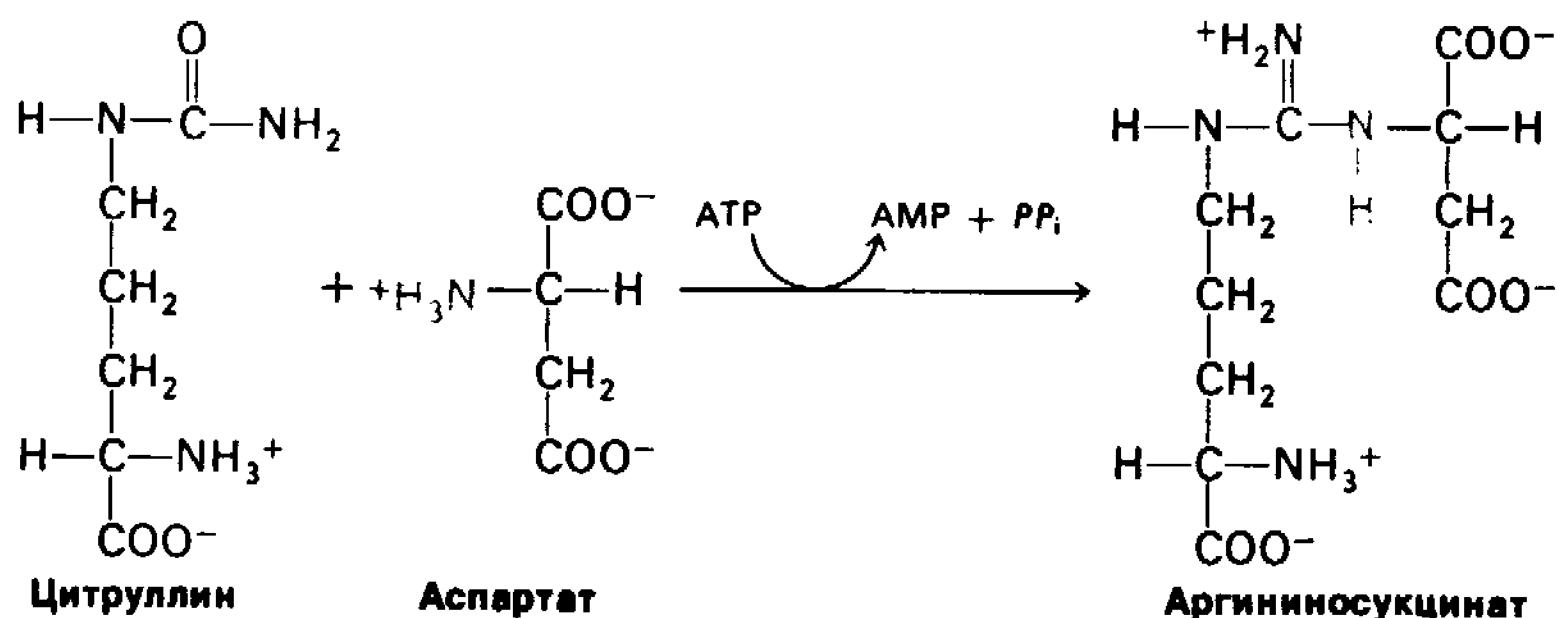
три группы организмов носят название *уреотелических*, *урикотелических* и *аммонотелических*.

У наземных позвоночных мочевина синтезируется в *цикле мочевины*. Эту последовательность реакций постулировали Ганс Кребс и Курт Гензеляйт (Hans Krebs, Kurt Henseleit) в 1932 г.– за пять лет до открытия цикла трикарбоновых кислот. Цикл мочевины – в сущности первый обнаруженный циклический метаболический путь. Один из атомов азота мочевины, синтезируемой в этом цикле, происходит из аммиака, другой – из аспартата. Углеродный атом мочевины происходит из CO_2. Переносчиком этих атомов углерода и азота в цикле мочевины служит *орнитин*.

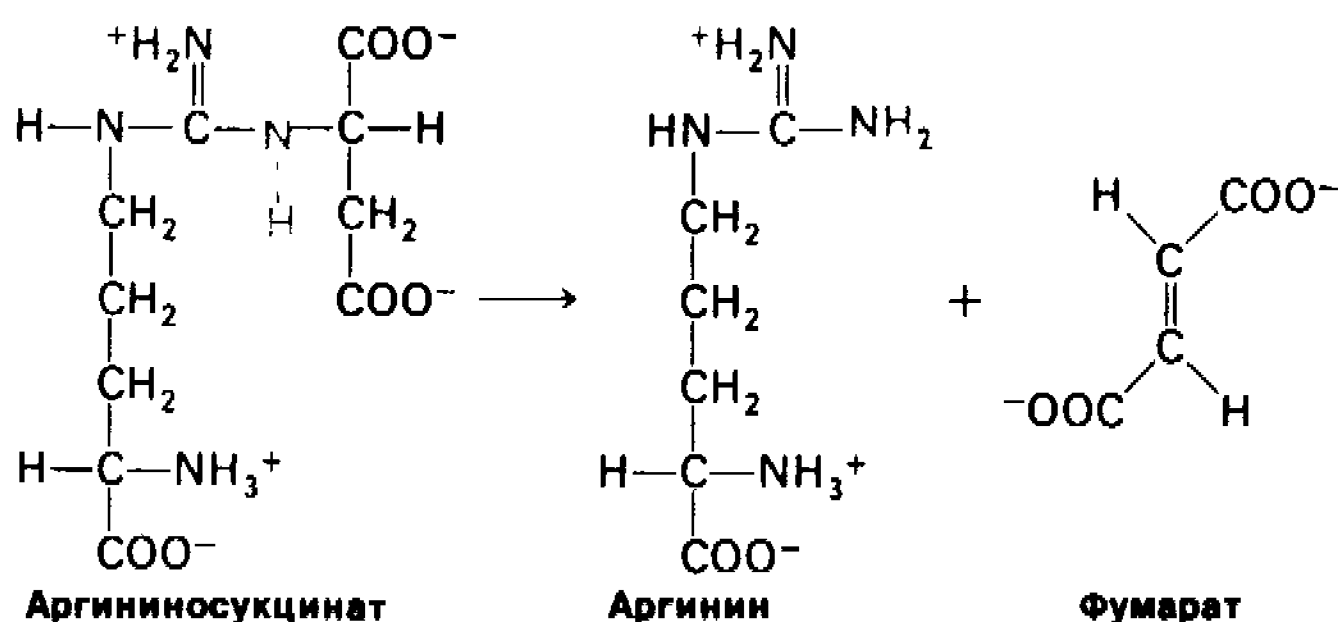
Непосредственным предшественником мочевины является *аргинин*, который гидролизуется *аргиназой* на мочевину и орнитин. В результате других реакций цикла мочевины происходит синтез аргинина из орнитина. Вначале имеет место перенос карбамоильной группы на орнитин с образованием *цитруллина*, катализируемый орнитин-карбамоилтрансферазой. Донором карбамоильной группы в этой реакции служит карбамоилфосфат, обладающий высоким потенциалом переноса благодаря наличию ангидридной связи.

Аргининосукцинат-синтетаза катализирует далее конденсацию цитруллина и аспарата. Этот синтез *аргининосукцината* запускается расщеплением ATP на AMP и пирофосфат и последующим гидролизом пирофосфата.

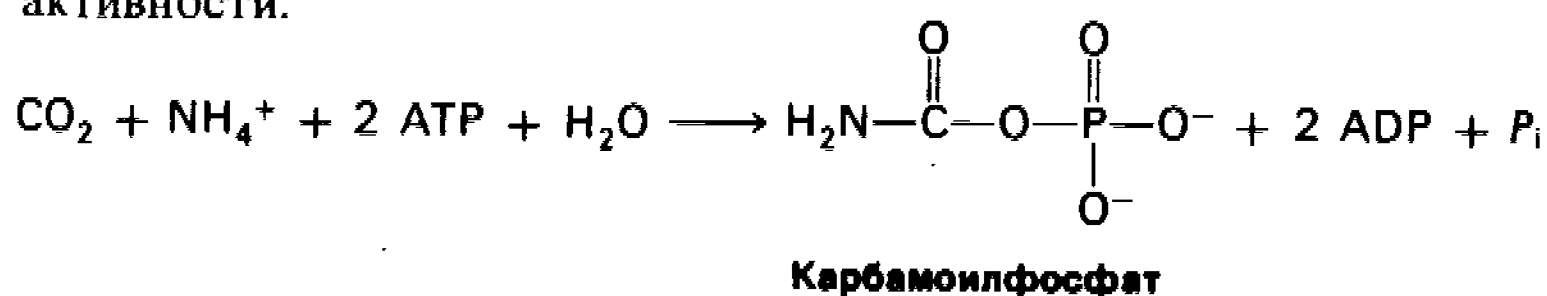




На последнем этапе аргининосукциназа расщепляет аргининосукцинат на *аргинин* и фумарат. Отметим, что в этих реакциях переноса аминогруппы аспартата с образованием аргинина углеродный скелет аспартата сохраняется.



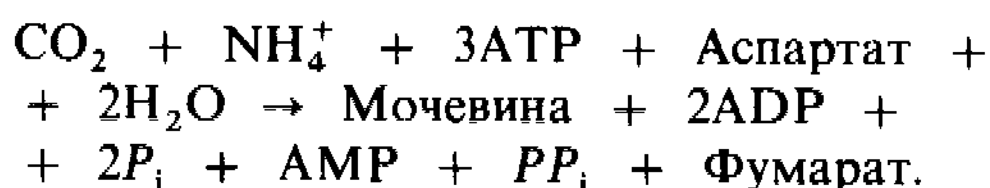
Карбамоилфосфат синтезируется из NH_4^+, CO_2, ATP и H_2O в результате сложной реакции, катализируемой *карбамоилфосфат-синтазой*. Необычным свойством этого фермента является потребность в N-ацетилглутамате для проявления его активности.



Потребление двух молекул ATP обусловливает фактическую необратимость синтеза карбамоилфосфата.

18.5. Цикл мочевины связан с циклом трикарбоновых кислот

Стехиометрия синтеза мочевины следующая:



$$CO_2 + NH_4^+ + 3ATP + \text{Аспартат} + 2H_2O \rightarrow \text{Мочевина} + 2ADP + 2P_i + AMP + PP_i + \text{Фумарат}.$$

Пирофосфат бытро гидролизуется, и, таким образом, для синтеза одной молекулы мочевины используются четыре высокоэнергетические фосфатные связи. *Важную роль в цикле мочевины играет синтез фумарата, поскольку он связывает между собой цикл мочевины и цикл трикарбоновых кислот* (рис. 18.5). Фумарат гидратируется в малат, который в свою очередь окисляется в оксалоацетат. Для этого промежуточного продукта, имеющего ключевое значение, существует несколько возможных путей превращения: 1) он может подвергаться трансаминированию в аспартат; 2) он может превращаться в глюкозу по пути глюконеогенеза; 3) он может конденсироваться с ацетил-СоА, образуя цитрат.

Примечательна также компартментация цикла мочевины и связанных с ним реакций. Образование NH_4^+ под действием глутаматдегидрогеназы, его включение в карбамоилфосфат и последующий синтез цитруллина происходят в митохондриальном матриксе. В отличие от них следующие три реакции цикла мочевины, приводящие к образованию мочевины, протекают в цитозоле.

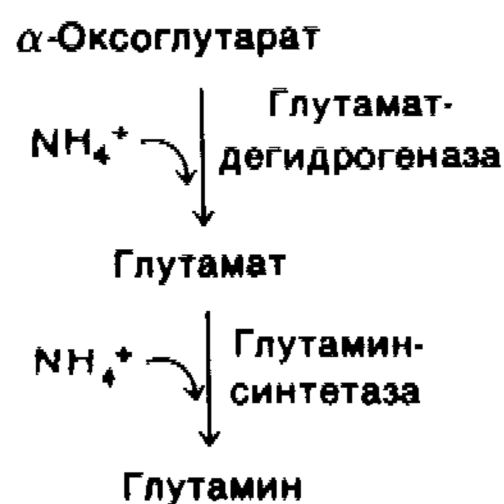


Рис. 18.5. Цикл мочевины, цикл трикарбоновых кислот и трансаминирование оксалоацетата связаны между собой через фумарат и аспартат.

18.6. Наследственные ферментные нарушения цикла мочевины приводят к гипераммонемии

Высокая концентрация NH_4^+ токсична для человека. Главный путь удаления NH_4^+ – это синтез мочевины в печени. Полное блокирование какой-либо из стадий цикла мочевины в печени, по-видимому, несовместимо с жизнью, потому что другого известного пути синтеза мочевины не существует. Диагностированы наследственные нарушения, вызываемые частичным блокированием одной из реакций цикла мочевины. *Общим признаком таких нарушений является повышенное содержание NH_4^+ в крови (гипераммонемия).* Почти полная недостаточность какого-либо из ферментов цикла мочевины вызывает кому и приводит к смерти вскоре после рождения. Частичная недостаточность этих ферментов вызывает задержку умственного развития, летаргию, временами рвоту. Малобелковая диета приводит к снижению содержания аммиака в крови и к улучшению клинической картины при мягких формах этих наследственных нарушений.

Почему высокое содержание NH_4^+ токсично? Возможно, это объясняется тем, что высокая концентрация иона аммония сдвигает равновесие реакции, катализируемой глутамат-дегидрогеназой, в сторону образования глутамата, а это приводит к *истощению α-оксоглутарата.* Реакция может быть далее стимулирована путем включения NH_4^+ в глутамат с образованием глутамина (разд. 21.2). Истощение α-оксоглутарата, промежуточного продукта цикла трикарбоновых кислот, приводит к *уменьшению скорости образования ATP.* Мозг отличается высокой чувствительностью к снижению содержания ATP.



18.7. Судьба атомов углерода распавшихся аминокислот

Мы рассмотрели ряд реакций, приводящих к удалению из аминокислот α-аминогруппы и превращению ее в мочевину. Теперь мы обратимся к судьбе оставшихся углеродных скелетов. *Стратегия разрушения аминокислот состоит в образовании главных промежуточных продуктов обмена веществ, которые могут превращаться в глюкозу или окисляться в цикле трикарбоновых кислот.* В самом деле, углеродные скелеты разнообразного набора из двадцати аминокислот направленно превращаются всего в семь молекул: *пируват, ацетил-СоА, ацетоацетил-СоА, α-оксоглутарат, сукцинил-СоА, фумарат и оксалоацетат.* Мы сталкиваемся здесь еще с одним примером замечательной экономичности метаболических превращений.

Аминокислоты, распадающиеся с образованием ацетил-СоА или ацетоацетил-СоА, называются *кетогенными,* поскольку в результате их распада повышается содержание кетоновых тел. Аминокислоты же, рас-

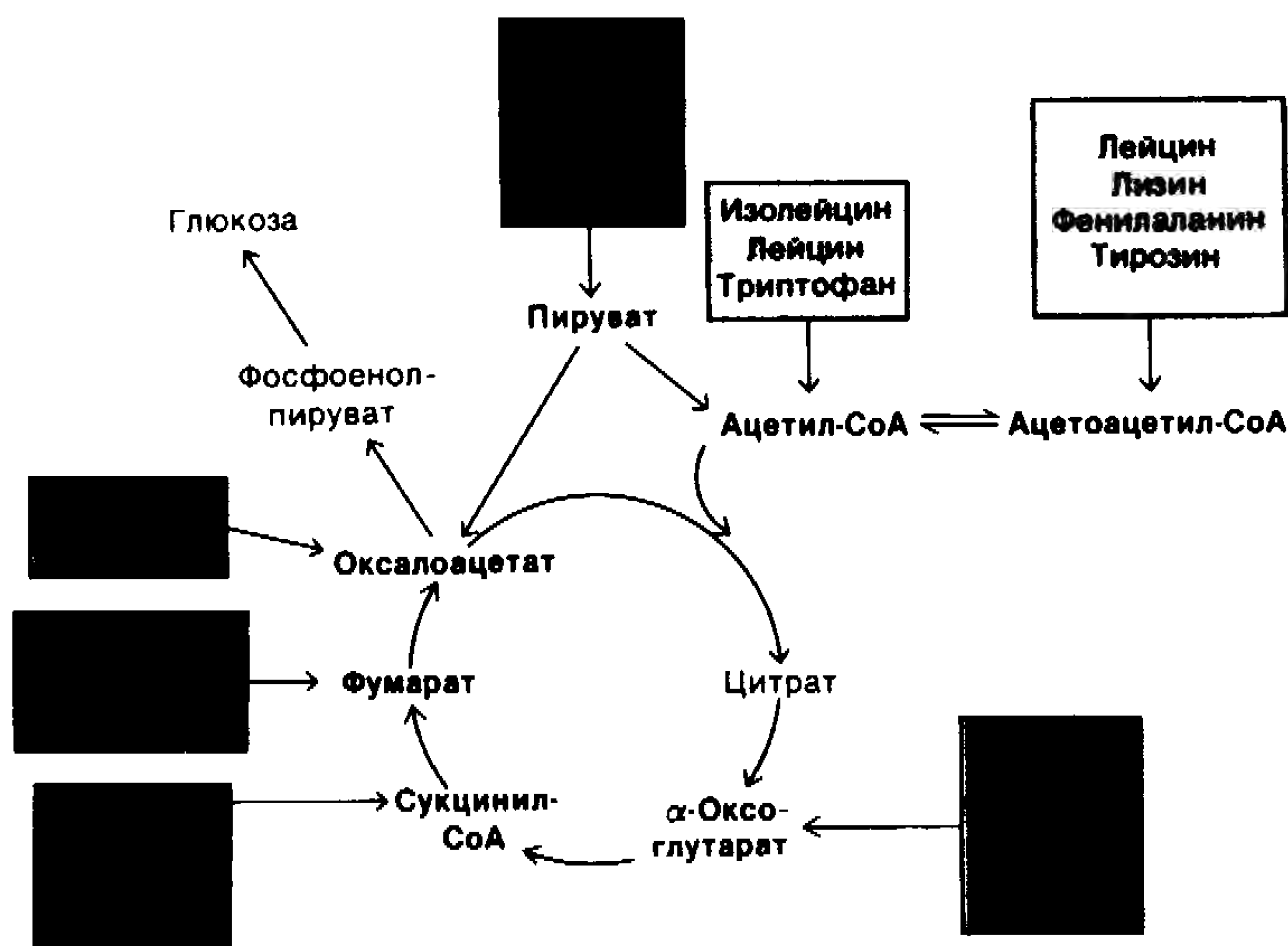


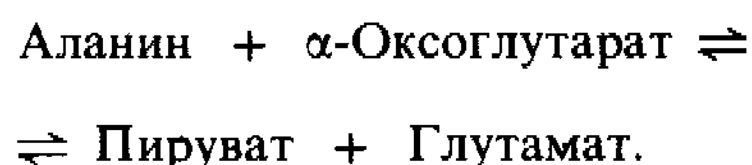
Рис. 18.6. Судьба углеродных скелетов аминокислот. Глюкогенные аминокислоты показаны красным цветом, кетогенные – желтым.

пад которых приводит к образованию пирувата, α-оксоглутарата, сукцинил-CoA, фумарата или оксалоацетата, названы *глюкогенными*. Возможность синтеза глюкозы из этих аминокислот обеспечивается тем обстоятельством, что указанные компоненты цикла трикарбоновых кислот и пируват могут превращаться в фосфоенолпируват и затем–в глюкозу (разд. 15.13.). Напомним, что у млекопитающих отсутствует путь, обеспечивающий непосредственный синтез глюкозы из ацетил-CoA или ацетоацетил-CoA.

Из основного набора, включающего двадцать аминокислот, только лейцин является исключительно кетогенным. Изолейцин, лизин, фенилаланин, триптофан и тирозин относятся одновременно и к кетогенным, и к глюкогенным аминокислотам. Некоторые из их углеродных атомов появляются в ацетил-CoA или ацетоацетил-CoA, тогда как другие обнаруживаются в потенциальных предшественниках глюкозы. Остальные четырнадцать аминокислот являются чисто глюкогенными.

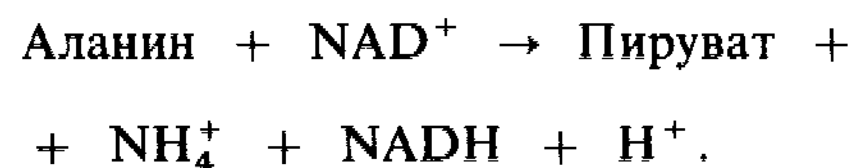
18.8. Семейство C_3-аминокислот: аланин, серин и цистеин превращаются в пируват

Пируват служит «пунктом входа» (в цикл трикарбоновых кислот) для трехуглеродных аминокислот: аланина, серина и цистеина (рис. 18.7). Трансаминирование аланина дает непосредственно пируват:



$$\text{Аланин} + \alpha\text{-Оксоглутарат} \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons \text{Пируват} + \text{Глутамат}.$$

Как указывалось выше (разд. 18.1), глутамат затем подвергается окислительному дезаминированию, приводящему к образованию NH_4 и регенерированию α-оксоглутарата. Суммарная реакция этих превращений описывается уравнением



$$\text{Аланин} + NAD^+ \rightarrow \text{Пируват} +$$
$$+ NH_4^+ + NADH + H^+.$$

Другая простая реакция в распаде аминокислот представляет собою *дезаминирование серина в пируват* под действием серин-дегидратазы (разд. 18.3):



$$\text{Серин} \rightarrow \text{Пируват} + NH_4^+.$$

Цистеин может превращаться в пируват различными путями с появлением атома серы в H_2S, SO_3^{2-} или SCN^-.

Возможно превращение в пируват и углеродных атомов двух других аминокислот. *Глицин* может превращаться в серин путем ферментативного присоединения гидроксиметильной группы (разд. 21.5). Из *треонина* пируват может образовываться через аминоацетон.

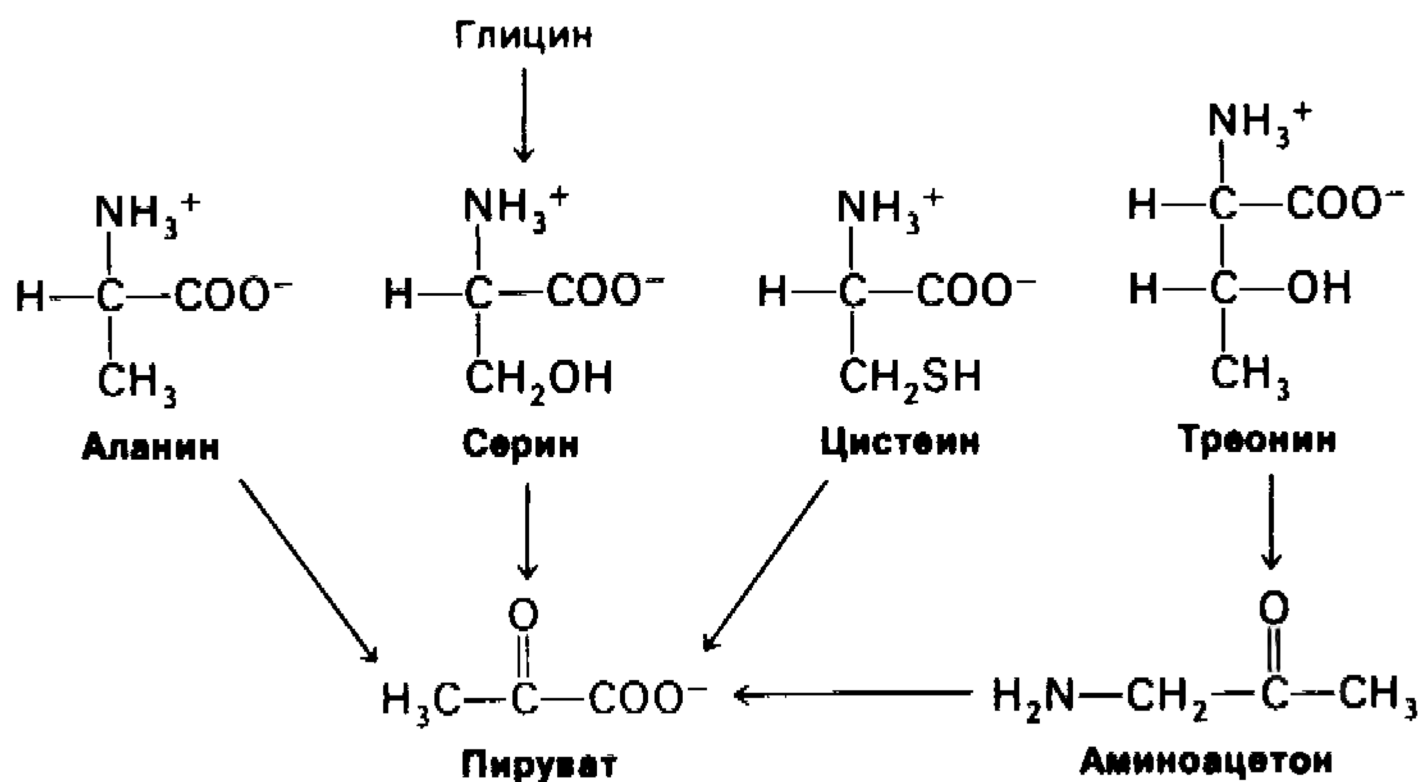


Рис. 18.7. Пируват – «пункт входа» для аланина, серина, цистеина, глицина и треонина.

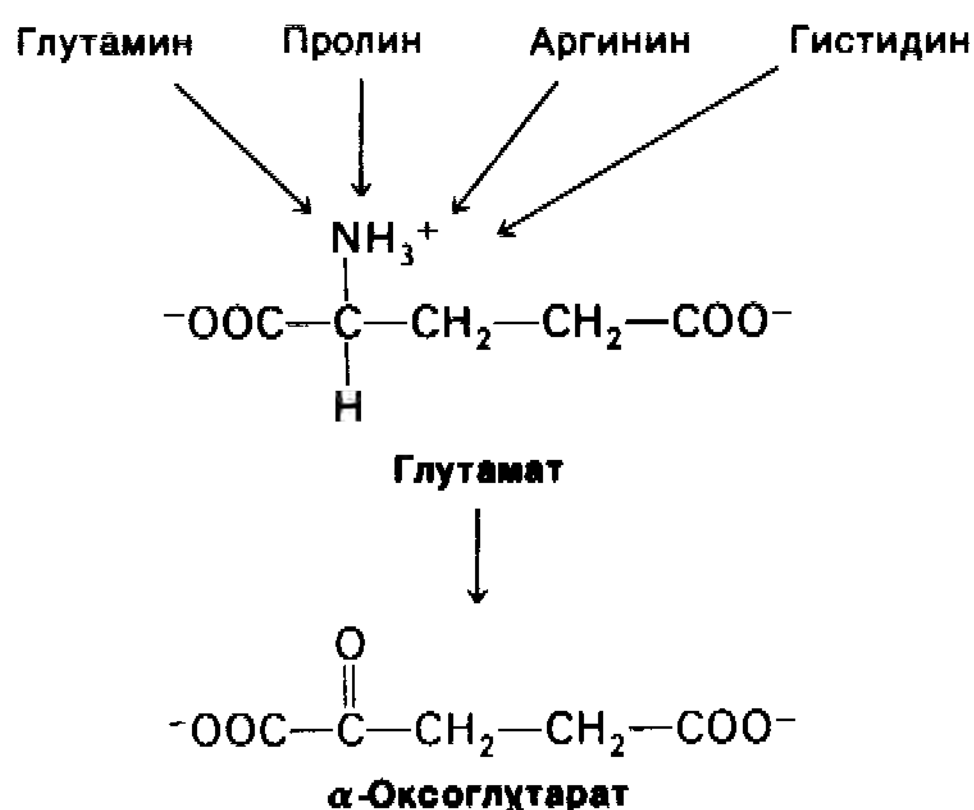
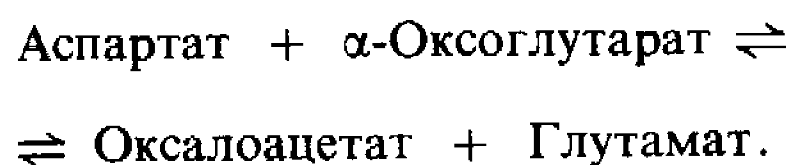


Рис. 18.8. α-Оксоглутарат – «пункт входа» для некоторых C_5-аминокислот, которые сначала превращаются в глутамат.

18.9. Семейство C_4-аминокислот: аспартат и аспарагин превращаются в оксалоацетат

Аспартат, аминокислота, содержащая четыре атома углерода, прямо *трансаминируется в оксалоацетат*, промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот:



Аспартат + α-Оксоглутарат ⇌

⇌ Оксалоацетат + Глутамат.

Аспарагин гидролизуется под действием *аспарагиназы*, образуя NH_4^+ и аспартат, ко-

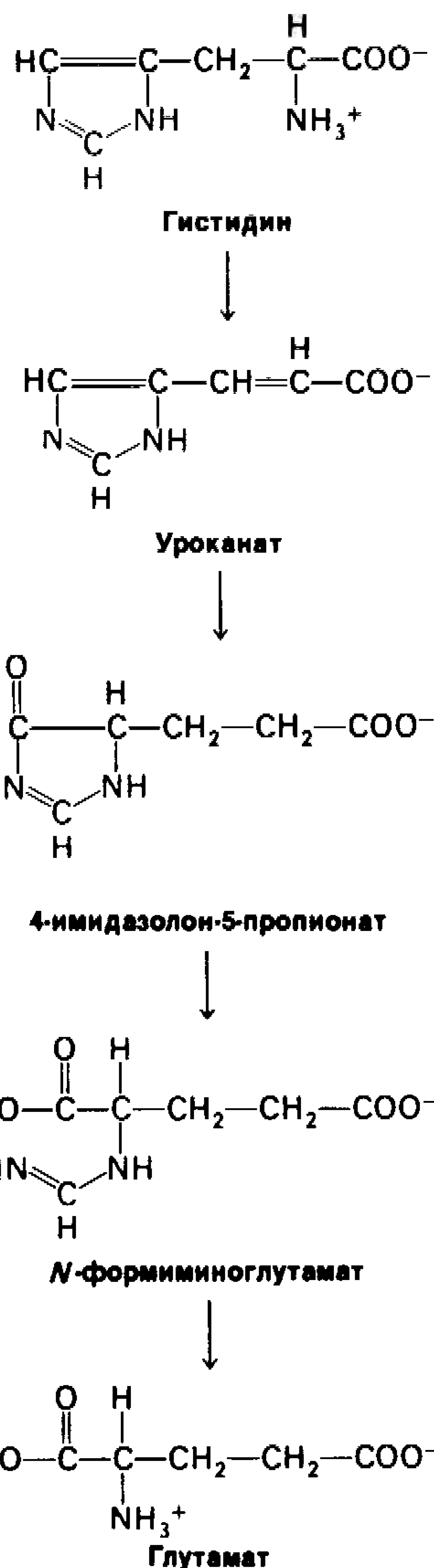


Рис. 18.9. Превращение гистидина в глутамат.

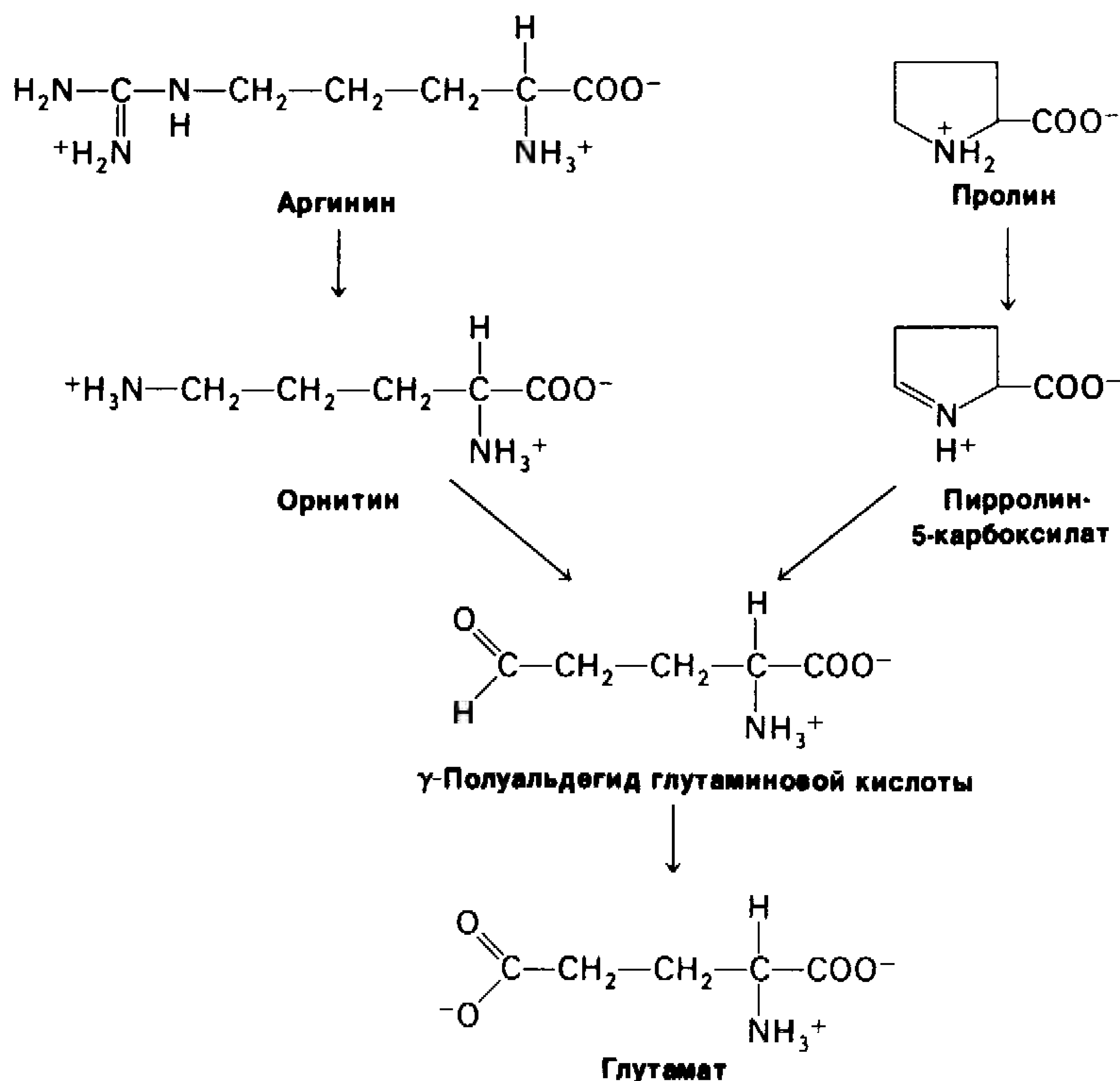


Рис. 18.10. Превращение пролина и аргинина в глутамат.

торый затем подвергается трансаминированию.

Напомним, что аспартат может также превращаться в *фумарат* через цикл мочевины (разд. 18.5). Фумарат служит «пунктом входа» для половины углеродных атомов тирозина и фенилаланина, что будет вкратце обсуждено ниже.

18.10. Семейство C_5-аминокислот: некоторые аминокислоты превращаются в α-оксоглутарат через глутамат

Углеродные скелеты некоторых пятиуглеродных аминокислот включаются в цикл трикарбоновых кислот в виде *α-оксоглутарата.* Эти аминокислоты превращаются в *глутамат*, который затем подвергается окислительному дезаминированию под действием глутамат-дегидрогеназы с образованием α-оксоглутарата (рис. 18.8).

Гистидин превращается в 4-имидазолон-5-пропионат (рис. 18.9). Амидная связь в кольце этого промежуточного продукта гидролизуется с образованием N-формиминопроизводного глутамата, которое далее превращается в глутамат путем переноса его формиминовой группы на тетрагидрофолят, переносчик активированных одноуглеродных фрагментов (разд. 21.6).

Глутамин гидролизуется глутаминазой с образованием глутамата и NH_4^+. *Пролин* и *аргинин* превращаются в γ-полуальдегид глутаминовой кислоты, который затем окисляется в глутамат (рис. 18.10).

18.11. Сукцинил-кофермент А – пункт включения в цикл трикарбоновых кислот для некоторых аминокислот

Сукцинил-СоА является тем соединением («пунктом входа»), в виде которого происходит включение в цикл трикарбоновых кислот некоторых углеродных атомов метионина, изолейцина, треонина и валина. Промежуточным продуктом, образующимся при распаде этих четырех аминокислот, служит метилмалонил-СоА (рис. 18.11).

Особенно интересен путь от пропионил-СоА к сукцинил-СоА. Пропионил-СоА в присутствии избытка АТР карбоксилируется с образованием D-изомера метилмалонил-СоА. Эта реакция карбоксилирования катализируется *пропионил-СоА—карбоксилазой*, биотиновым ферментом, каталитический механизм которого сходен

Треонин

Метионин Изолейцин

Валин

$$CH_3-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA \longrightarrow {}^-OOC-\underset{CH_3}{\overset{H}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA \longrightarrow {}^-OOC-CH_2-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-S-CoA$$

Пропионил-CoA Метилмалонил-CoA Сукцинил-CoA

Рис. 18.11. Превращение метионина, изолейцина, треонина и валина в сукцинил-CoA.

с таковым ацетил-CoA—карбоксилазы и пируват-карбоксилазы. D-изомер метилмалонил-CoA рацемизуется в L-изомер, который служит субстратом для мутазы, превращающей его в сукцинил-CoA.

$$\text{Пропионил-CoA} \xrightarrow[\text{ATP} \quad \text{PP}_i]{HCO_3^- + \quad AMP +} \text{D-Метилмалонил-CoA} \rightleftharpoons \text{L-Метилмалонил-CoA}$$

Сукцинил-CoA образуется из L-метилмалонил-CoA в результате *внутримолекулярной перегруппировки.* Группа—CO—S—CoA мигрирует от C-2 к C-3 в обмен на атом водорода. *Эта очень необычная изомеризация катализируется метилмалонил-CoA—мутазой, одним из двух известных ферментов млекопитающих, содержащих в качестве кофермента производное витамина B_{12}.*

$$\text{L-Метилмалонил-CoA} \rightleftharpoons \text{Сукцинил-CoA}$$

Путь от пропионил-CoA к сукцинил-CoA участвует также в окислении *жирных кислот с нечетным числом атомов углерода.* В результате последней реакции тиолитического расщепления ацил-CoA с нечетным количеством углеродных атомов образуются ацетил-CoA и пропионил-CoA (разд. 17.11).

18.12. Ферменты, содержащие в качестве простетической группы кобаламин (витамин B_{12}), катализируют процессы перегруппировки и метилирования

Кобаламин (витамин B_{12}) привлекает к себе большой интерес биохимиков и врачей с тех пор, как в 1926 г. Георг Мино (George Minot) и Виллиам Мерфи (William Murphy) открыли, что пернициозную анемию можно лечить введением в рацион больных больших количеств печени. Кобаламин был получен в очищенном виде и кристаллизован в 1948 г. Его сложную трехмерную структуру раскрыла Дороти Ходжкин (Dorothy Hodgkin) в 1956 г. Ядро кобаламина состоит из *корринового кольца с центрально расположенным атомом кобальта* (рис. 18.12). Корриновое кольцо, подобно порфирину, имеет *четыре пиррольных кольца.* Два из них (кольца A и D) прямо связаны друг с другом, а другие соединяются при помощи метиленовых мостиков, как это имеет место в порфиринах. Заместителями в пиррольных кольцах являются метильная, пропионамидная и ацетамидная группы.

Атом кобальта связан с четырьмя атомами азота пиррольных колец. *Пятый заместитель* (на рис. 18.13, расположенный ниже плоскости коррина) представляет собою производное *диметилбензимидазола,* содержащее рибозо-3-фосфат и аминоизопропанол. Один из атомов азота диметилбензимидазола связан с кобальтом. Аминогруппа аминоизопропанола связана амидной связью с боковой цепью кольца D. *Шестой заместитель* при атоме кобальта (на

рис. 18.13 расположенный над плоскостью коррина) может быть представлен CN^-, —CH_3, OH^- или дезоксиаденозилом. Присутствие цианид-иона в шестом координационном положении цианкобаламина, наиболее обычной среди получаемых в промышленном масштабе форм витамина, является результатом процедуры его выделения. In vivo цианид не связан с кобаламином.

Атом кобальта в кобаламине может находиться в степени окисления +1, +2 или +3. В гидроксокобаламине (в котором шестое координационное положение занимает OH^-) атом кобальта находится в степени окисления +3. Эта форма, $B_{12а}$ (Co^{3+}), восстанавливается до двухвалентного состояния, называемого B_{12r} (Co^{2+}), под действием флавопротеин-редуктазы. B_{12r} вос-

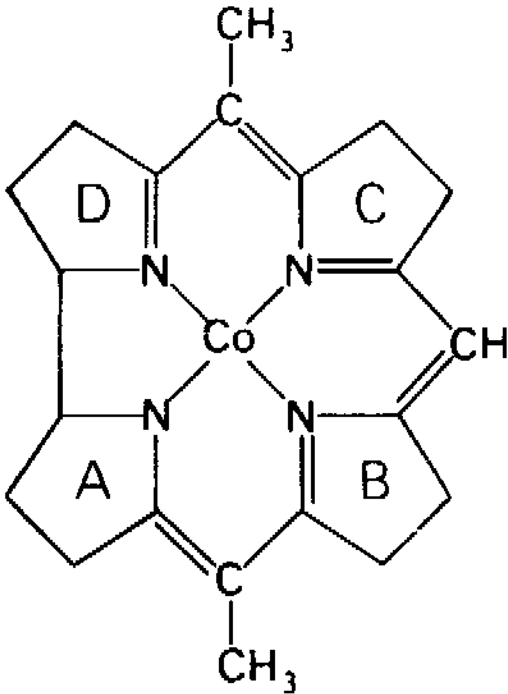


Рис. 18.12. Корриновое ядро кобаламина. Заместители при пирролах и двух других кобальтовых лигандах на этой схеме не показаны.

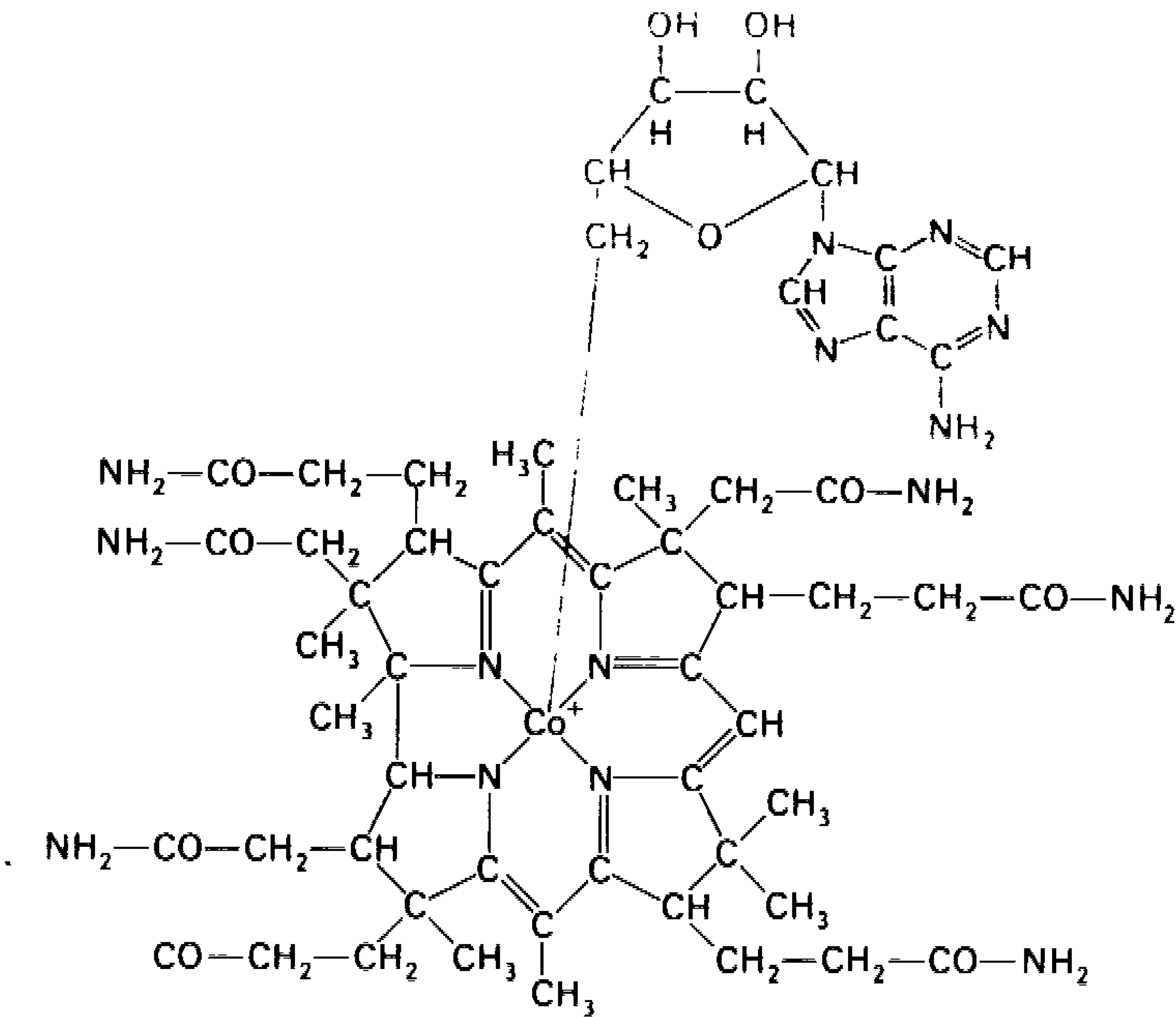


Рис. 18.13. Структура 5′-дезоксиаденозилкобаламина.

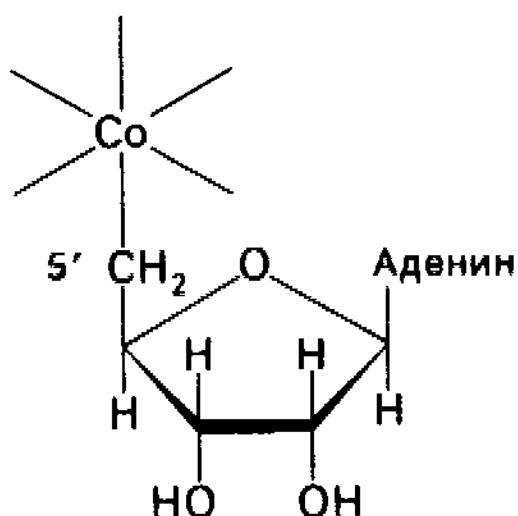
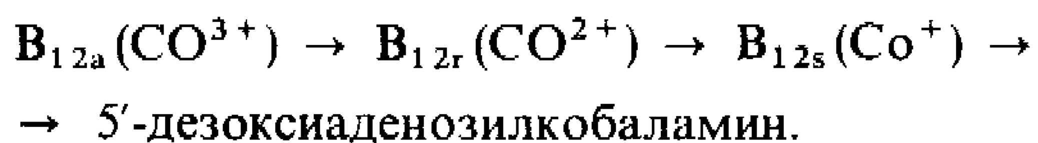


Рис. 18.14. 5′-углеродный атом 5′-дезоксиаденозина находится в координационной связи с атомом кобальта 5′-дезоксиаденозилкобаламина. Это – единственный известный пример связи углерод – металл в биомолекуле.

станавливается второй флавопротеин-редуктазой в B_{12s} (Co^+). Восстановителем в обеих реакциях служит NADH. Форма B_{12s} представляет собою субстрат для последней ферментативной реакции, приводящей к образованию активного кофермента. 5′-дезоксиаденозильная группа переносится с ATP на витамин B_{12s} (Co^+), образуя *5′-дезоксиаденозилкобаламин, являющийся коферментом метилмалонил-СоА - мутазы (рис. 18.13).*



$$B_{12a}(CO^{3+}) \rightarrow B_{12r}(CO^{2+}) \rightarrow B_{12s}(Co^{+}) \rightarrow$$
$\rightarrow$ 5′-дезоксиаденозилкобаламин.

Кобаламиновые ферменты катализируют реакции двух типов: 1) *реакции перегруппировки*, например превращение L-метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА, и 2) реакции *метилирования*, например синтез метионина (разд. 21.7). Перегруппировка представляет собою взаимообмен двух групп, присоединенных к соседним углеродным атомам (рис. 18.16). Атом водорода мигрирует от одного атома углерода к следующему, а группа R одновременно перемещается в противоположном направлении. При этих внутримолекулярных перестройках разрушается связь углерод—кобальт в 5′-дезоксиаденозилкобаламине. Углеродный атом субстрата, отдающий свой атом водорода, оказывается временно связанным с кобальтом.

18.13. При пернициозной анемии нарушается всасывание кобаламина

Всасывание кобаламина осуществляется специализированной системой транспорта. Желудок секретирует гликопротеин, называемый *внутренним фактором*, который связывает кобаламин в просвете кишечника. Образовавшийся комплекс связывается *специфическим рецептором на внутренней поверхности подвздошной кишки.* Комплекс кобаламина и внутреннего фактора далее диссоциирует под действием *высвобождающего фактора (рилизинг-фактора)* и с помощью механизма активного транспорта переносится через мембрану подвздошной кишки в кровоток. *Пернициозная анемия вызывается недостаточностью внутреннего фактора, приводящей к нарушению всасывания кобаламина.* Это заболевание было впервые вылечено скармливанием больным больших количеств печени, богатого источника кобаламина, так что достаточное количество витамина могло всасываться даже в отсутствие внутреннего фактора. Наиболее надежная терапия состоит во внутримышечном введении кобаламина с месячными интервалами.

Животные и растения неспособны синтезировать кобаламин. *Этот витамин уникален в том плане, что он, по-видимому, синтезируется только микроорганизмами*, в особенности анаэробными бактериями. Для человека в норме требуется менее 10 мкг кобаламина в день. Недостаточное содержание кобаламина в пище наблюдается редко, потому что этот витамин присутствует практически во всех животных тканях.

18.14. Известно несколько наследственных дефектов обмена метилмалонил-кофермента А

Недавно было охарактеризовано несколько *наследственных нарушений обмена метилмалонил-СоА.* Эти нарушения обычно проявляются в течение первого года жизни; при этом наиболее характерным симптомом является *ацидоз.* pH артериальной крови у таких людей равен примерно 7, тогда как в норме кровь имеет pH 7,4. *В моче появляются большие количества метилмалоната.* В норме человек выделяет в день менее 5 мг метилмалоната, в то время как у больного с нарушенным обменом метилмалонил-СоА эта величина может достигать 1 г и более. Примерно у половины больных с метилмалоновой ацидурией на-

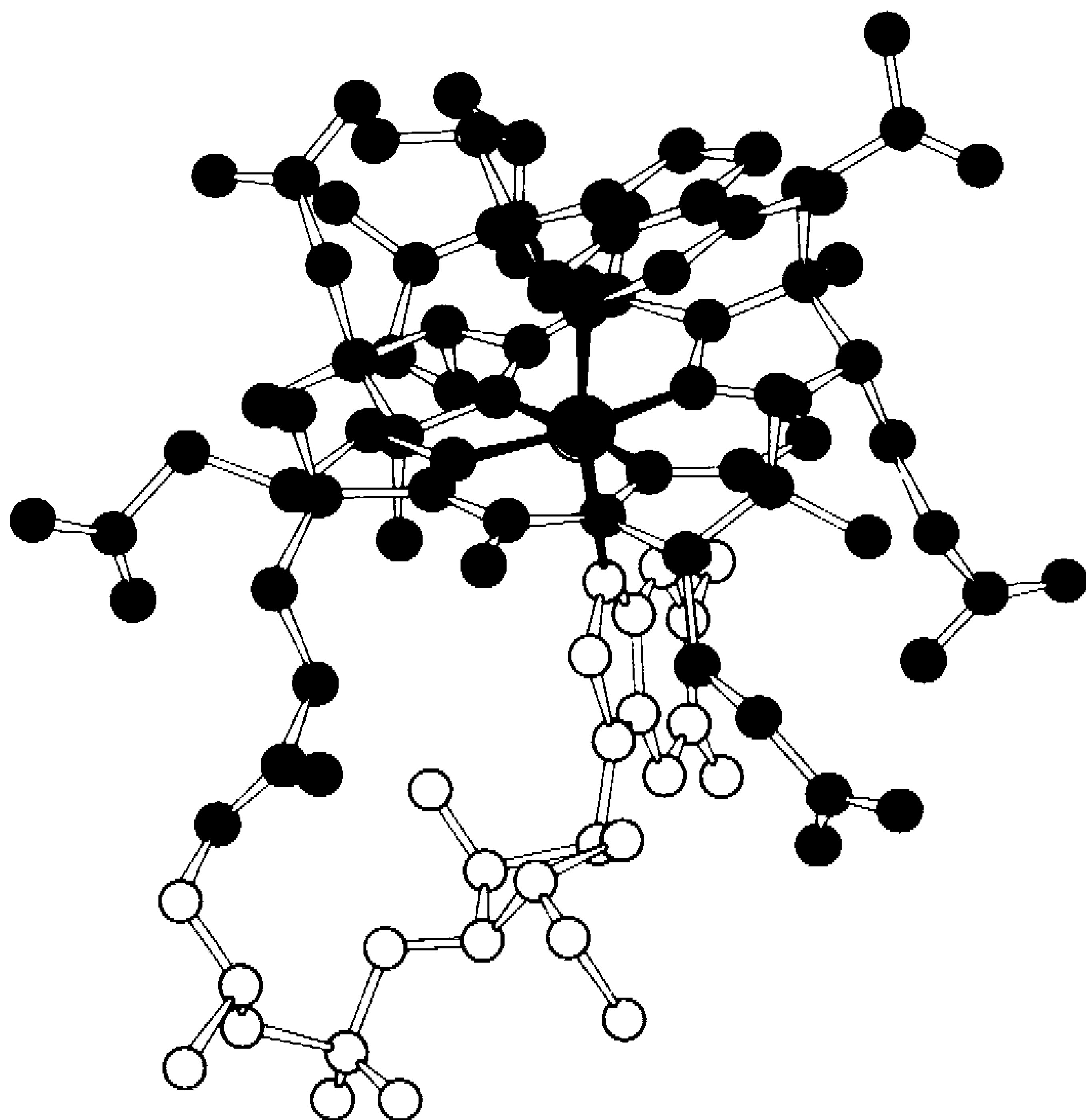


Рис. 18.15. Модель 5'-дезоксиаденозилкобаламина. Атом кобальта показан зеленым цветом, корриновый компонент – красным, дезоксиаденозильный компонент – голубым и бензимидазольный – желтым цветами.

ступает заметное улучшение при парантеральном введении больших доз кобаламина. pH артериальной крови возвращается к нормальному значению, экскреция метилмалоната значительно снижается. У таких реактивных больных обычно имеет место дефект трансферазы, катализирующий синтез дезоксиаденозилкобаламина:

$B_{12s}(Co^{+})$ —||——→ Дезоксиаденозилкобаламин

Однако не у всех больных с нарушенным обменом метилмалонил-СоА наблюдается улучшение при введении больших доз кобаламина. У некоторых из таких больных может иметь место дефект апофермента метилмалонил-СоА—мутазы. Эта форма метилмалоновой ацидурии часто приводит к летальному исходу.

18.15. Лейцин распадается на ацетил-кофермент А и ацетоацетил-кофермент А

Как упоминалось выше, лейцин – единственная чисто кетогенная аминокислота во всем наборе из двацати аминокислот. Он распадается в результате реакций, с которыми мы уже встречались, когда рассматривали расщепление жирных кислот и цикл трикарбоновых кислот. Сначала лейцин в результате трансаминирования превращается в соответствующую α-оксокислоту, *α-оксоизокапроат*. Эта оксокислота подвергается затем *окислительному декарбоксилированию*

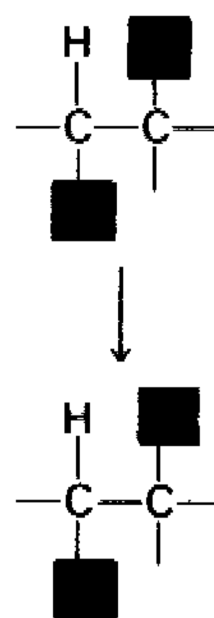
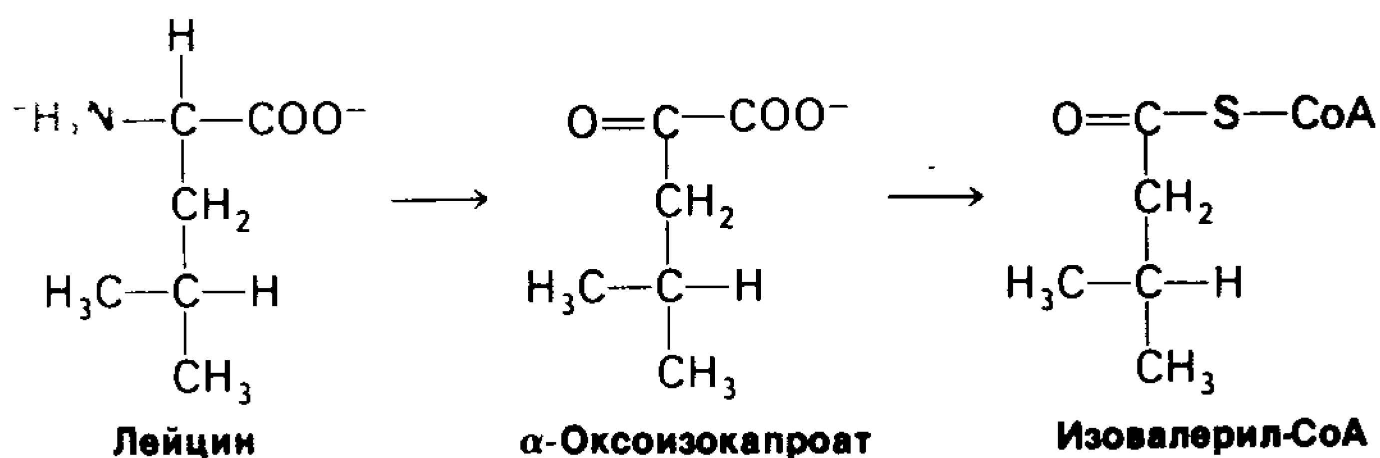


Рис. 18.16. Реакция перестройки, катализируемая кобаламиновыми ферментами. Группа R может быть аминогруппой, гидроксильной группой или любым углеродсодержащим заместителем.

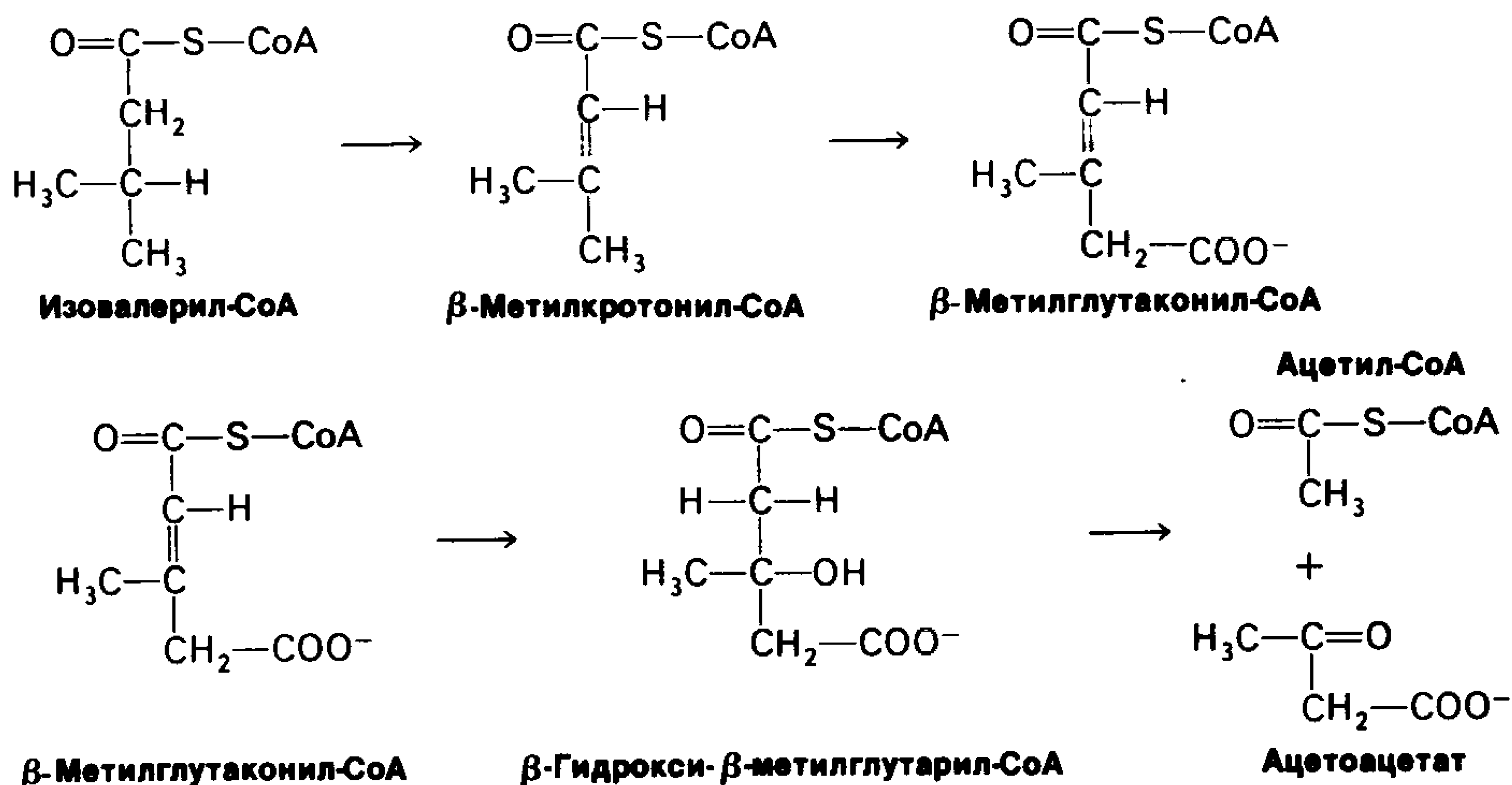


в изовалерил-СоА. Данная реакция аналогична окислительному декарбоксилированию пирувата в ацетил-СоА и α-оксоглутарата в сукцинил-СоА.

Изовалерил-СоА *дегидрируется,* прямо образуя β-*метилкротонил-СоА.* Это окисление катализируется изовалерил-СоА—дегидрогеназой; акцептором водорода при этом служит FAD, как в аналогичной реакции окисления жирных кислот, катализируемой ацил-СоА—дегидрогеназой. В результате *карбоксилирования* β-метилкротонил—СоА в условиях избытка АТР образуется β-*метилглутаконил-СоА.* Как и можно было предположить, механизм действия β-метилкротонил-СоА—карбоксилазы очень сходен с таковым пируват-карбоксилазы и ацетил-СоА—карбоксилазы. Здесь следует сказать, что значительной частью современных представлений о механизме зависимых от биотина реакций карбоксилирования мы обязаны работе Феодора Линена (Feodor Lynen) - пионера в исследовании этих ферментов.

Бета-метилглутаконил-СоА затем *гидратируется* с образованием β-*гидрокси*-β-*метилглутарил-СоА,* который расщепляется на *ацетил-СоА* и *ацетоацетат.* Эта реакция уже обсуждалась в связи с образованием кетоновых тел из жирных кислот (разд. 17.12). Интересно отметить, что в распаде лейцина до ацетил-СоА и ацетоацетата участвуют многие коферменты: *пиридоксальфосфат* в трансаминировании, *тиаминпирофосфат, липоат, FAD и NAD^+* в окислительном декарбоксилировании, снова FAD в дегидрировании и *биотин* в карбоксилировании. Переносчиком ацила в этих реакциях служит *кофермент А.*

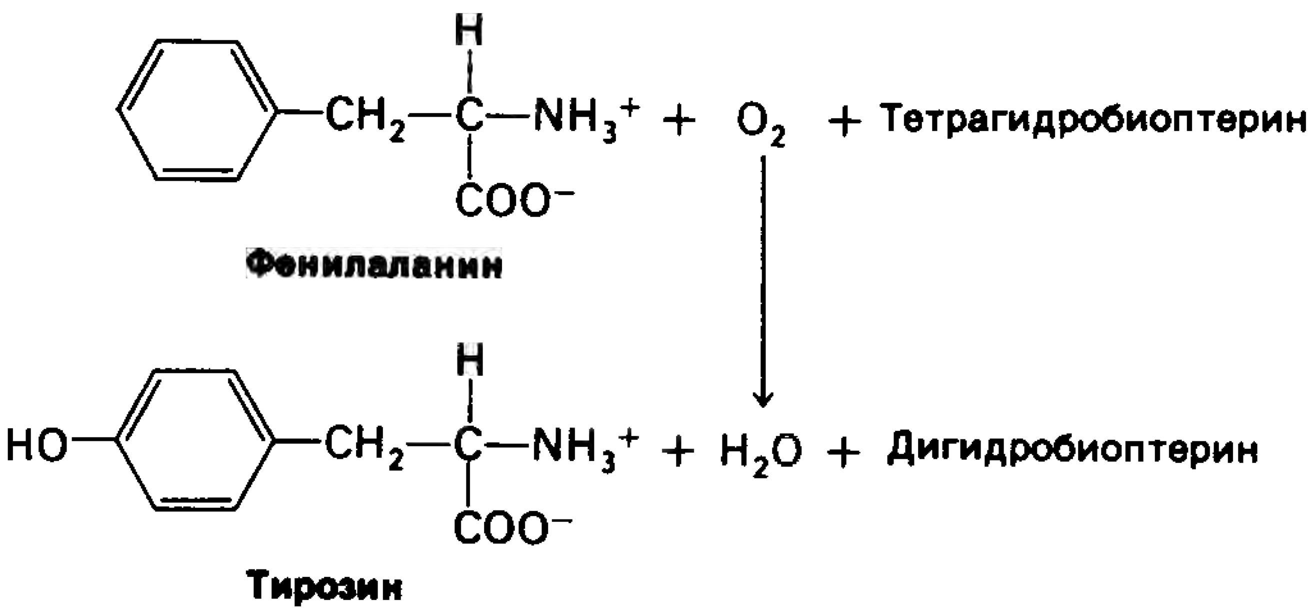
Пути расщепления валина и изолейцина сходны с таковым лейцина. Все три аминокислоты сначала трансаминируются в соответствующие α-оксокислоты, которые затем подвергаются окислительному декарбоксилированию с образованием СоА-производного. Последующие реакции сходны с реакциями окисления жирных кислот. Изолейцин дает ацетил-СоА и пропионил-СоА, тогда как валин образует метилмалонил-СоА. Существует врожденный дефект метаболизма, при котором нарушается окисление валина, изолейцина и лейцина. При *болезни «кленового сиропа»* блокируется окислительное декарбоксилирование этих трех аминокислот. В результате количество лейцина, изолейцина и валина в крови и мо-



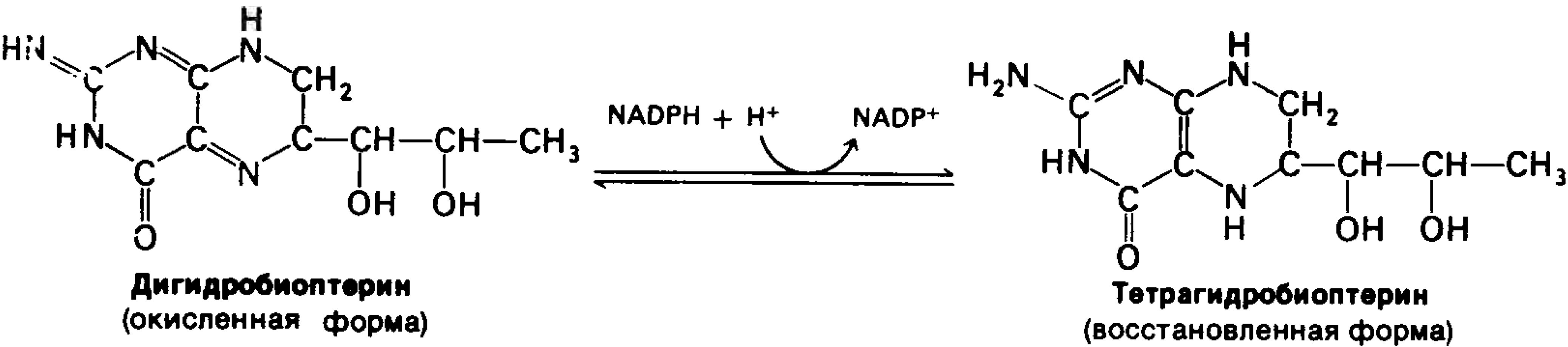
че значительно увеличивается, что приводит к соответствующему повышению содержания α-оксокислот, происходящих из этих аминокислот. Моча таких больных издает запах кленового сиропа, откуда и происходит название заболевания. Болезнь «кленового сиропа» приводит обычно к летальному исходу, если только больные не переводятся с раннего возраста на диету с низким содержанием валина, изолейцина и лейцина.

18.16. Фенилаланин и тирозин распадаются под действием оксигеназ на ацетоацетат и фумарат

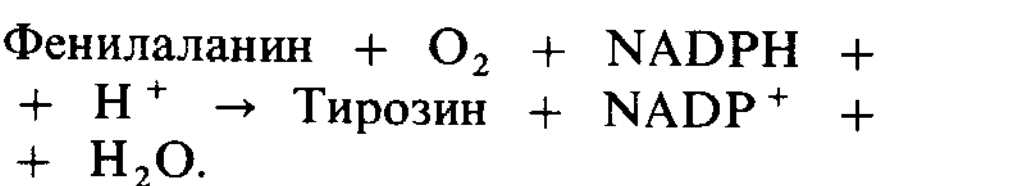
Путь распада фенилаланина и тирозина имеет некоторые очень интересные особенности. Он представляет собой последовательность реакций, в которых *молекулярный кислород используется для расщепления ароматического кольца*. Первый этап данной последовательности реакций – гидроксилирование фенилаланина в тирозин – реакция, катализируемая *фенилаланин-гидроксилазой*. Этот фермент назван *монооксигеназой* (он называется также *оксигеназой со смешанной функцией*), потому что один атом O_2 появляется в продукте реакции, другой – в H_2O.



Роль восстановителя здесь выполняет *тетрагидробиоптерин*, до сих пор не рассматривавшийся нами переносчик электронов. Его окисленной формой является *дигидробиоптерин*.



NADPH восстанавливает дигидробиоптерин с регенерированием тетрагидробиоптерина; реакция катализируется дигидробиоптерин-редуктазой. Суммарное уравнение реакций, катализируемых фенилаланингидроксилазой и дигидроптеринредуктазой, имеет следующий вид:



$$\text{Фенилаланин} + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow \text{Тирозин} + NADP^+ + H_2O.$$

Следующий этап – трансаминирование тирозина в *п*-гидроксифенилпируват (рис. 18.17). Эта α-оксокислота реагирует затем с O_2 с образованием *гомогентизата*. Фермент, катализирующий эту сложную реакцию, *п*-гидроксифенилпируват-гидроксилаза, назван *диоксигеназой*, потому что оба атома O_2 включаются в образующийся продукт. Ароматическое кольцо гомогентизата далее расщепляется молекулой O_2 с образованием *4-малеилацетоацетата*. Реакция катализируется другой диоксигеназой – гомогентизатоксидазой. На самом деле, *почти все процессы расщепления ароматических колец в биологических системах катализируются диоксигеназами*, классом ферментов, открытых Осами Хайяши (Osami Hayaishi). 4-малеилацетоацетат затем изомеризуется в *4-фумарилацетоацетат*, который в конечном итоге гидролизуется на *фумарат* и *ацетоацетат*.

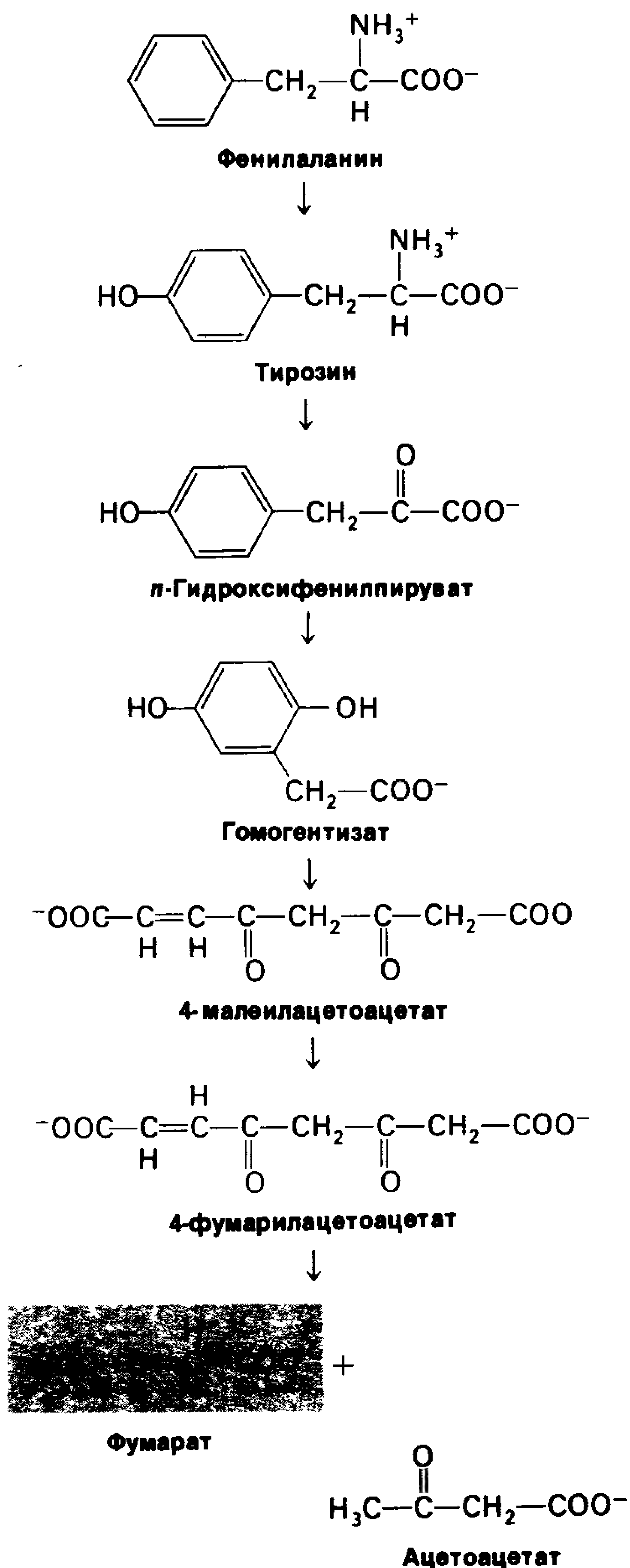


Рис. 18.17. Путь распада фенилаланина и тирозина.

18.17. Открытие Гэрродом наследственных нарушений метаболизма

Алкаптонурия – наследственное нарушение метаболизма, вызываемое отсутствием гомогентизат-оксидазы. Гомогентизат накапливается и выделяется с мочой, которая вследствие этого чернеет при стоянии, поскольку гомогентизат окисляется и полимеризуется в меланиноподобное соединение. Алкаптонурия – сравнительное доброкачественное состояние (легкое нарушение), как описал ее Закутус Лузитанус (Zacutuc Lusitanus) в 1649 г.:

«Больной был мальчик, моча которого имела черный цвет и который в возрасте 14 лет был подвергнут сильнодействующему лечению, имевшему целью смягчить огненный жар его внутренностей, виновный, как полагали, в его болезни, обжигавший и придававший черный цвет его желчи. В числе предписанных мер были кровопускания, очищение желудка, ванны, холодная и жидкая пища и множество лекарств. Ни одна из этих мер не дала видимого эффекта, и в конце концов больной, уставший от бесполезного и чрезмерного лечения, решил дать вещам идти своим естественным ходом. Ни одно из зловещих предсказаний не сбылось, он женился, стал родоначальником большой семьи, прожил долгую и благополучную жизнь, все время выделяя мочу черную, как чернила».

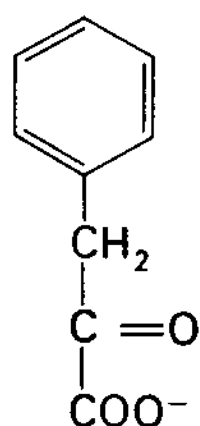
В 1902 г. Арчибальд Гэррод (Archibald Gorrod) показал, что алкаптонурия наследуется как единичный рецессивный менделевский признак. Далее он установил, что гомогентизат является нормальным промежуточным продуктом при расщеплении фенилаланина и тирозина и что накопление гомогентизата при алкаптонурии обусловлено блокированием его распада. Гэррод заключает, что «расщепление бензольного кольца в ходе нормального метаболизма – результат действия специального фермента, а при врожденной алкаптонурии этот фермент отсутствует». Он пришел к выводу о существовании прямой связи между генами и ферментами и о важном значении химической индивидуальности. Его книга «Врожденные ошибки метаболизма» была для своего времени самым ярким и важным вкладом в биологию и медицину.

Меланин –

черный пигмент в коже и волосах. Название происходит от греческого melan, что означает «черный». Этот полимерный пигмент образуется в меланосомах – гранулах, богатых *тирозиназой*, монооксигеназой.

18.18. Блокирование гидроксилирования фенилаланина может привести к резко выраженной умственной отсталости

Фенилкетонурия, врожденное нарушение обмена фенилаланина, в отличие от алкаптонурии может оказывать сильное разрушительное действие на организм. Нелеченные больные с фенилкетонурией почти всегда отличаются *резко выраженной умственной отсталостью.* Действительно, примерно у 1% пациентов психиатрических клиник обнаруживается фенилкетонурия. Вес мозга



Фенилпируват

таких больных ниже нормы, у них нарушена миелинизация нервов, отмечается гиперактивность рефлексов. Продолжительность жизни нелеченных больных резко сокращена. Половина из них умирает в возрасте 20 лет, три четверти – в возрасте 30 лет.

Фенилкетонурия вызывается *отсутствием или недостатком фенилаланин-гидроксилазы* или, реже,– ее тетрагидробиоптеринового кофактора. *Фенилаланин* не может превратиться в тирозин и поэтому *накапливается во всех жидкостях тела.* Некоторые превращения фенилаланина, количественно несущественные в норме, становятся заметными при фенилкетонурии. Наиболее значительным из них является трансаминирование фенилаланина с образованием *фенилпирувата.* В основе самого названия болезни лежит высокое содержание этого фенилкетона в моче. Из фенилпирувата образуются фениллактат, фенилацетат и *о*-гидроксифенилацетат. α-Аминогруппа глутамина образует амидную связь с карбоксильной группой фенилацетата, давая фенилацетилглутамин.

Существует множество других видов нарушения аминокислотного обмена, связанных с фенилкетонурией,– в особенности это касается обмена ароматических соединений. Кожа и волосы у больных фенилкетонурией светлее , чем у их сибсов. Гидроксилирование тирозина – это первый этап в образовании пигмента меланина. При фенилкетонурии эта реакция конкурентно ингибируется высоким содержанием фенилаланина, так что образование меланина уменьшается. *Биохимическая основа задержки умственного развития при нелеченной фенилкетонурии представляет собой загадку.*

При рождении дети с фенилкетонурией производят впечатление здоровых, однако при отсутствии лечения уже в возрасте одного года появляются тяжелые нарушения. Лечение фенилкетонурии сводится к приему *пищи с низким содержанием фенилаланина.* Цель заключается в том, чтобы поступление фенилаланина в организм не превышало потребности в нем для роста и замещения. Белки, исходно содержащие малые количества фенилаланина, такие, как казеин молока, гидролизуют и удаляют фенилаланин путем адсорбции. Бедную фенилаланином пищу надо начинать давать сразу после рождения, чтобы предотвратить развитие необратимых повреждений мозга. В одном из исследований в группе больных фенилкетонурией, лечение которых было начато в течение нескольких недель после рождения, среднее значение IQ (коэффициента интеллектуальности) составляло 93, а в контрольной группе сибсов, которых начали лечить в возрасте одного года, IQ равнялся в среднем 53.

Ранняя диагностика фенилкетонурии имеет большое значение и осуществляется по программам массового скрининга. В последние годы мочу новорожденных исследуют, добавляя в нее $FeCl_3$, который в присутствии фенилпирувата дает оливково-зеленое окрашивание. Предпочтительным диагностическим критерием из-за его большей надежности служит в настоящее время содержание фенилаланина в крови. Частота возникновения фенилкетонурии составляет около 1 случая на 20000 новорожденных.

«Природа никогда не раскрывает в такой степени свои секреты, как в тех случаях, когда она оставляет следы своей работы в стороне от проторенного пути. Нет лучшего способа для достижения успеха в практической медицине, чем обратить наш взгляд на раскрытие обычных законов природы путем внимательного исследования редких форм заболеваний».

Уильям Гарвей (1657)

Болезнь наследуется как *аутосомный рецессивный признак*. Гетерозиготы, составляющие примерно 1,5% типичной популяции, не обнаруживают видимых отклонений от нормы. У носителей гена фенилкетонурии снижено содержание фенилаланин-гидроксилазы и соответственно повышено содержание фенилаланина в крови. Эти критерии, однако, не являются абсолютными, потому что уровень содержания в крови фенилаланина у носителей дефектного гена и у нормальных лиц в некоторой степени перекрывают друг друга. Более точным тестом на носительство данного гена является измерение кинетики исчезновения внутривенно введенного фенилаланина. Следует отметить, что высокое содержание фенилаланина в крови беременной женщины может привести к нарушениям в развитии плода. Это - яркий пример взаимоотношений матери и плода на молекулярном уровне.

Заключение

Избыточные аминокислоты используются как метаболическое топливо. Деградация большинства избыточных аминокислот начинается с удаления α-аминогруппы путем трансаминирования с α-оксокислотой. Коферментом всех трансаминаз служит пиридоксальфосфат. Аминогруппы переносятся на α-оксоглутарат с образованием глутамата, который затем подвергается окислительному дезаминированию под действием глутамат-дегидрогеназы, давая NH_4^+ и α-оксоглутарат. Акцепторами электронов в этой реакции служат NAD^+ или $NADP^+$. У наземных позвоночных NH_4^+ превращается в мочевину в цикле мочевины. Мочевина образуется в результате гидролиза аргинина. В ходе последующих реакций цикла мочевины происходит синтез аргинина из орнитина, другого продукта реакции гидролиза. Сначала орнитин подвергается карбамоилированию в цитруллин при участии карбамоилфосфата. Цитруллин затем конденсируется с аспартатом, образуя аргининосукцинат, который расщепляется на аргинин и фумарат. Атом углерода и один атом азота мочевины происходят из карбамоилфосфата, синтезирующегося из CO_2, NH_4^+ и ATP. Другой атом азота мочевины происходит из аспартата. При синтезе одной молекулы мочевины используются четыре высокоэнергетические фосфатные связи.

Углеродные атомы распавшихся аминокислот превращаются в пируват, ацетил-СоА, ацетоацетат или промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот. Большинство аминокислот являются только глюкогенными, одна - исключительно кетогенной и несколько могут быть и кето- и глюкогенными. При расщеплении аланина, серина, цистеина, глицина и треонина образуется пируват. Аспарагин и аспартат превращаются в оксалоацетат. α-Оксоглутарат представляет собою «пункт входа» (в цикл трикарбоновых кислот) для глутамата и четырех аминокислот (глутамина, гистидина, пролина и аргинина), которые могут быть превращены в глутамат. Сукцинил-СоА - «пункт входа» для некоторых углеродных атомов еще четырех аминокислот (метионина, изолейцина, треонина и валина), распад которых идет через метилмалонил-СоА. Для изомеризации метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА требуется дезоксиаденозилкобаламин, производное витамина B_{12}. Лейцин распадается до ацетоацетил-СоА и ацетил-СоА. Ароматические кольца тирозина и фенилаланина распадаются под действием оксигеназ. Фенилаланин-гидроксилаза, монооксигеназа, использует в качестве восстановителя тетрагидробиоптерин. Некоторые углеродные атомы фенилаланина и тирозина превращаются в фумарат, тогда как другие появляются в ацетоацетате.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Книги по аминокислотному обмену

Meister A., 1965. Biochemistry of the Amino Acids (2nd ed.), vols 1 and 2, Academic Press.

Bender D. A., 1975. Amino Acid Metabolism, Wiley.

Grisolia S., Báguena R., Mayor F. (eds.), 1976. The Urea Cycle, Wiley.

Механизмы реакций

Walsh C., 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms, Freeman. (Содержит прекрасный анализ каталитических механизмов для пиридоксальфосфатных ферментов, кобаламиновых ферментов и оксигеназ.)

Snell E. E., DiMari S. J., 1970. Schiff base intermediates in enzyme catalysis. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 2, pp. 335–370, Academic Press.

Barker H. A., 1972. Coenzymes B_{12}-dependent mutases causing carbon chain rearrangements. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 6, pp. 509–537.

Abeles R., Dolphin D., 1976. The Vitamin B_{12} coenzyme, Acc. Chem. Res., 9, 114–120.

Corey E. J., Cooper N. J., Green M. L. H., 1977. Biochemical catalysis involving coenzyme B-12: a rational stepwise mechanistic interpretation of vicinal interchange rearrangements, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 811–815.

Наследственные нарушения

Nyhan W. L. (ed.), 1975. Hereditable Disorders of Amino Acid Metabolism, Wiley.

Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. E. (eds.), 1978. The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), McGraw-Hill. [Содержит прекрасные статьи по наследственным нарушениям аминокислотного обмена, включая работы Шиха (Shih) по расстройствам цикла мочевины, Розенберга (Rosenberg) по обмену витамина B_{12}, Туриана (A. J. Turian) и Сидбори (J. B. Sidbyry) по фенилкетонурии.]

Garrod A. E., 1909. Inborn Errors in Metabolism, Oxford University Press (reprinted in 1963 with a supplement by H. Harris).

Процесс открытия

Childs B., 1970, Sir Archibald Garrod's *conception of chemical individuality: a modern appreciation, New Engl. J. Med.*, 282, 71–78.

Holmes F. L., 1980. Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle, Fed. Proc., 29, 216–225.

Вопросы и задачи

1. Назовите α-оксокислоту, образующуюся при трансаминировании каждой из следующих аминокислот:
а) аланина, б) аспартата,
в) глутамата, г) лейцина,
д) фенилаланина, е) тирозина.

2. Напишите уравнение равновесия для превращения аспартата в глюкозу через оксалоацетат. Укажите коферменты, участвующие в этих реакциях.

3. Напишите уравнение равновесия для превращения аспартата в оксалоацетат через фумарат.

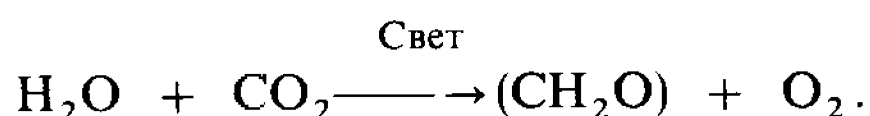
4. Проанализируйте механизм превращения L-метилмалонил-CoA в сукцинил-CoA под действием L-метилмалонил-CoA – мутазы.
а) Предложите эксперимент, позволяющий различить миграцию COO^--группы и —CO—S—CoA-группы в этой реакции.
б) На деле мигрирует группа —CO—S—CoA. Теперь предложите эксперимент для решения вопроса, какой перенос этой группы имеет место – межмолекулярный или внутримолекулярный?
в) Каково значение данных о том, что при проведении мутазной реакции в тритированной воде включения трития в сукцинил-CoA не происходит?

5. Пиридоксальфосфат стабилизирует карбанионные промежуточные продукты, функционируя в качестве улавливателя электронов. Какая другая простетическая группа катализирует реакции таким же путем?

ГЛАВА 19

Фотосинтез

Вся свободная энергия, потребляемая биологическими системами, возникает из солнечной энергии, которая улавливается в процессе фотосинтеза. Основное уравнение фотосинтеза на первый взгляд кажется простым:



$$H_2O + CO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + O_2 .$$

(CH_2O) в этом уравнении представляет собою углевод. Механизм фотосинтеза сложен и требует взаимодействия многих макромолекул и малых молекул. У зеленых растений фотосинтез протекает в хлоропластах – специализированных органеллах. Аппарат преобразования энергии является интегральным компонентом системы мембран в *тилакоидах* хлоропласта (рис. 19.1). Первый этап фотосинтеза – это поглощение света *молекулой хлорофилла*. Энергия переносится от одной молекулы хлорофилла к другой, пока не достигает молекулы с особыми свойствами в участке, называемом *реакционным центром*. Превращение света в химически используемую энергию происходит в реакционных центрах двух видов. На самом деле для осуществления фотосинтеза требуется *кооперирование двух световых реакций*. Одна из них, называемая *фотосистемой I*, генерирует восстановительную силу в форме NADPH, тогда как другая, называемая *фотосистемой II*, расщепляет воду с выделением O_2 и генерирует восстановитель. Протонный градиент через мембрану тилакоида генерируется, когда выделяется O_2 и когда поток электронов проходит по электрон-транспортной цепи, связывающей две фотосистемы. Синтез ATP, как и при окислительном фосфорилировании, запускается протонным градиентом. ATP может образовываться и без одновременного образования NADPH.

NADPH и ATP, образовавшиеся под действием света, используются в дальнейшем для восстановления CO_2 в углевод в серии темновых реакций, называемых *циклом Кальвина*. Эти реакции происходят в растворимом компоненте хлоропластов. Первым этапом служит взаимодействие CO_2 с рибулозобисфосфатом, приводящее к образованию двух молекул *3-фосфоглицерата*. Из 3-фосфоглицерата по пути глю-



Рис. 19.1. Электронная микрофотография части хлоропласта из листа шпината. Мембраны тилакоидов образуют стопки, называемые гранами. (Печатается с любезного разрешения д-ра Kenneth Miller.)



Электронная микрофотография целого хлоропласта из листа шпината. (Печатается с любезного разрешения д-ра Kenneth Miller.)

конеогенеза образуется гексоза и далее под действием транскетолазы, альдолазы и некоторых других ферментов происходит регенерирование рибулозобисфосфата. В одном обороте цикла для восстановления CO_2 до гексозофосфата используются 3 АТР и 2 NADPH.

19.1. Открытие основного уравнения фотосинтеза

Основное уравнение фотосинтеза в первом приближении могло быть написано уже в конце XVIII столетия. Образование кислорода при фотосинтезе было открыто Джозефом Пристли (Joseph Priestley) в 1780 г. Он обнаружил, что растения мо-

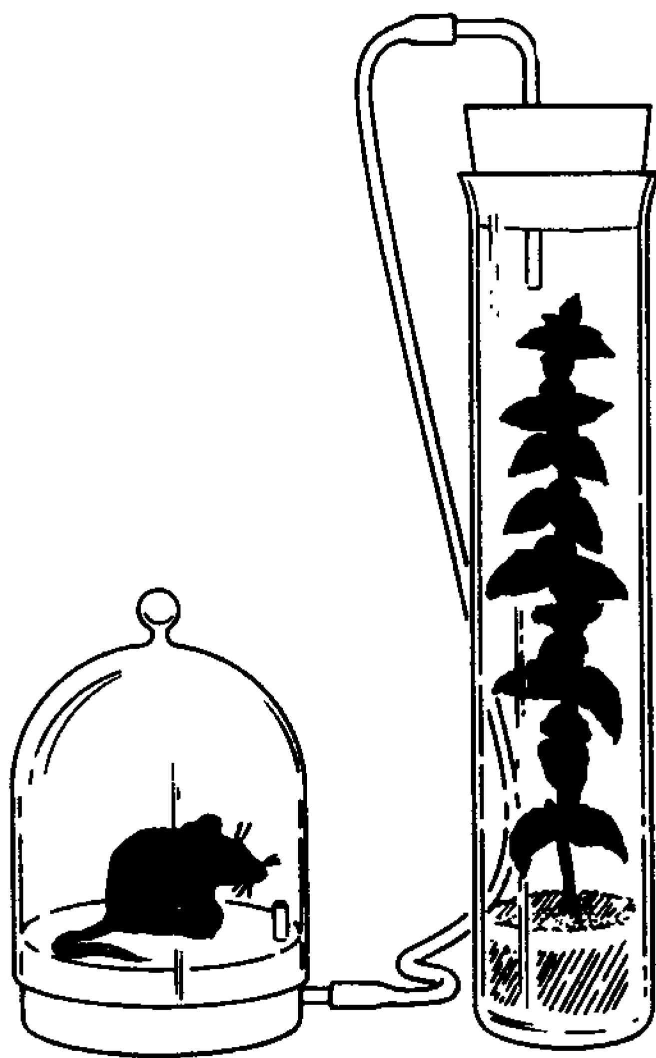


Рис. 19.2. Классический эксперимент Пристли по фотосинтезу. (Rabinowitch E. I., Photosynthesis, 1948, Scientific American Inc.)

гут «очищать воздух, который был испорчен горящей свечой». Пристли поместил побег мяты в перевернутую стеклянную банку, погруженную в сосуд с водой, и через несколько дней обнаружил, что «воздух в банке не гасил свечу, а когда я поместил в банку мышь, не причинял ей вреда». Этот крупный химик XVIII столетия был, кроме того, английским министром-нонконформистом. Его интересовали прежде всего теология, философия и политика. В 1791 г. из-за своих симпатий к Французской революции Пристли был вынужден покинуть Англию. Он отправился во Францию, потом в Соединенные Штаты, где скончался в 1804 г. после нескольких спокойных лет, проведенных на берегах Саскачевана. Совсем иной была судьба современника Пристли, заложившего фундамент для выяснения основного процесса фотосинтеза. Антуан Лавуазье (Antoine Lavoisier) разработал методы исследования газов и предложил концепцию окисления и закон сохранения массы в химических реакциях. Будучи связан с монархистами, он был казнен в 1794 г. французскими революционерами. Судья, который произнес приговор, добавил, что «Республика не нуждается в ученых».

Следующий важный вклад в изучение фотосинтеза внес Ян Ингенхауз (Jan Ingenhousz), датчанин, придворный медик австрийской императрицы. Ингенхауз был светским человеком и любил посещать Лондон. Однажды он услышал обсуждение опытов Пристли по восстановлению воздуха растениями и так был захвачен этой проблемой, что решил при первой же возможности поставить некоторые эксперименты. Такая возможность представилась через шесть лет, когда Ингенхауз снял виллу вблизи Лондона и провел лето, с лихорадочным увлечением выполнив более пятисот экспериментов. Он открыл роль света в фотосинтезе:

> «Я обнаружил, что растения не только обладают способностью улучшать плохой воздух за шесть или десять дней, когда растут в нем, как указывают эксперименты доктора Пристли, но что они полностью выполняют эту важную функцию в течение нескольких часов. *Этот удивительный процесс обусловливается не ростом растения, а влиянием на него солнечного света*».

Ингенхауз торопился опубликовать свои наблюдения, поскольку опасался, что кто-нибудь опередит его. В конце лета он выпустил книгу под названием «*Опыты на растениях, раскрывающие их великую способность очищать обычный воздух на солнечном свету и ухудшать его в тени и ночью*».

Эта боязнь конкуренции была оправданной. Аналогичные эксперименты проводились в Женеве швейцарским пастором Жаном Сенебье (Jean Senebier). Он сделал выдающийся вклад в изучение фотосинтеза, показав, что в процессе фотосинтеза происходит потребление «фиксированного воздуха», а именно CO_2. Роль воды в фотосинтезе была установлена также в Женеве Теодором де Соссюром (Theodore de Saussure). Он нашел, что суммарный вес органического вещества, образуемого растениями, и выделяющегося O_2 значительно превышает вес потребленного CO_2. На основе закона сохранения вещества, открытого Лавуазье, де Соссюр заключил, что имеет место использование еще одного вещества. Поскольку компонентами его системы являлись только CO_2, вода и свет, де Соссюр пришел в выводу, что таким ре-

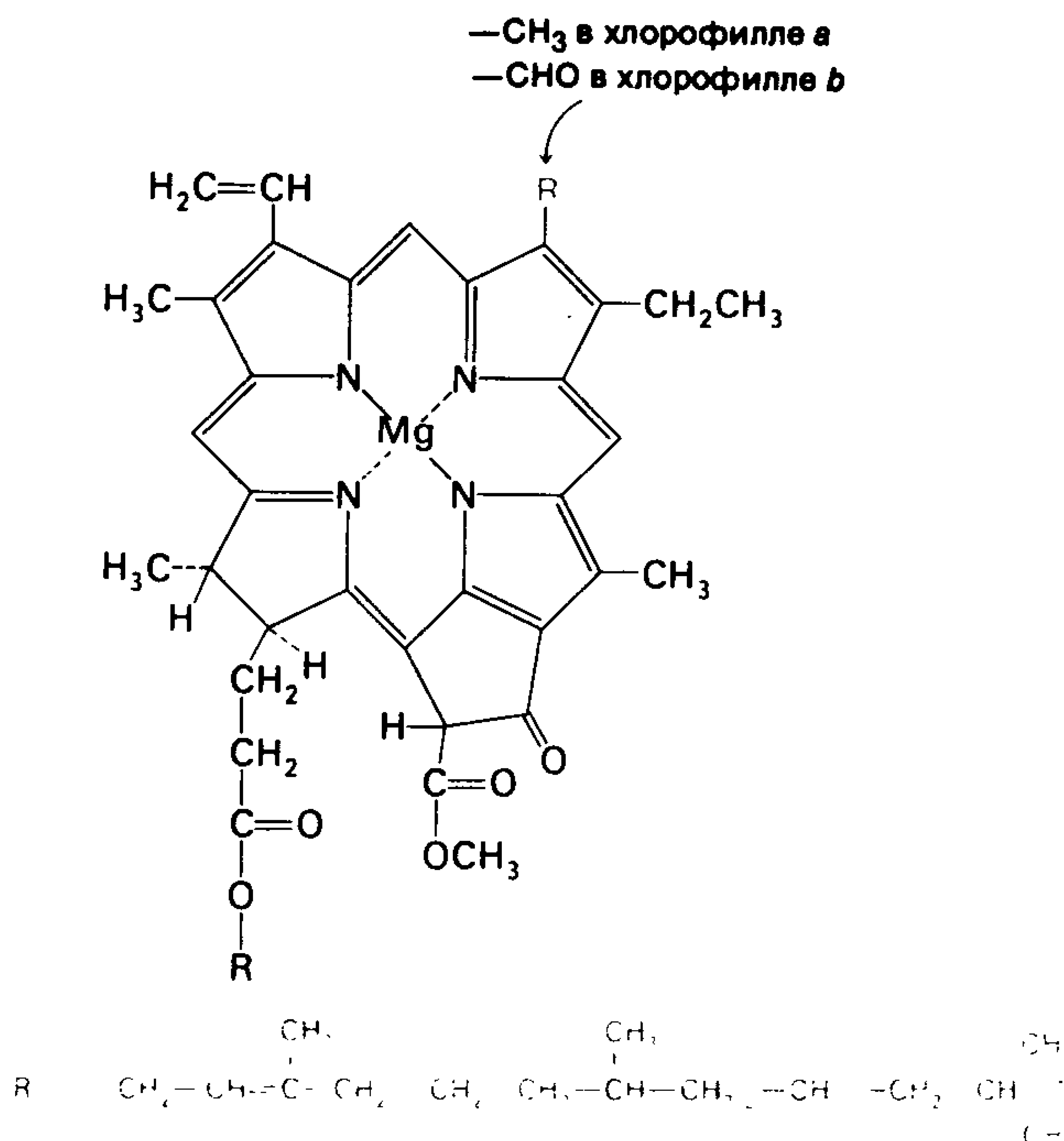


Рис. 19.3. Формулы хлорофиллов *a* и *b*.

агентом должна быть вода.

Окончательный вклад в раскрытие основного уравнения фотосинтеза был сделан почти на полвека позднее. В 1842 г. Юлиус Роберт Майер (Julius Robert Mayer), немецкий хирург, открыл закон сохранения энергии. Майер установил, что растения превращают солнечную энергию в химическую свободную энергию:

«Растения потребляют один вид энергии – свет и преобразуют ее в другой вид энергии – химическую».

Количество энергии, запасаемой при фотосинтезе, огромно. На земле ежегодно в процессе фотосинтеза запасается более 10^{17} ккал свободной энергии, что соответствует ассимиляции более 10^{10} т углерода, включающего в состав углеводов и других форм органических веществ.

19.2. Хлорофиллы представляют собой фоторецепторные молекулы

Майер говорил: «Природа поставила перед собой задачу: как уловить потоки света, льющиеся на землю, и как хранить в твердой форме этот самый неуловимый из всех видов энергии?» Каков механизм улавливания этой самой неуловимой энергии? Первый этап – поглощение света фоторецепторной молекулой. Основным фоторецептором в хлоропластах зеленых растений служит *хлорофилл a*, замещенный тетрапиррол. Четыре атома азота пиррольных колец координированы с атомом магния. Таким образом, хлорофилл представляет собою *магнийпорфирин*, тогда как гем является железопорфирином. Порфириновая кольцевая структура хлорофилла отличается от структуры гема по нескольким параметрам: 1) одно из пиррольных колец частично восстановлено; 2) с одним из пиррольных колец слито циклопентаноновое кольцо; 3) в хлорофилле обе кислотные боковые цепи этерифицированы, тогда как в геме они свободны. Одна из кислотных цепей в хлорофилле представляет собою метиловый эфир, вторая – эфир фитола ($C_{20}C_{39}OH$). Этот многоатомный спирт состоит из четырех изопреновых единиц, которые сообщают ему высокую гидрофобность. *Хлорофилл b* отличается от хлорофилла *a* природой заместителя при одном из пиррольных колец: в хлорофилле *b* это – формильная группа вместо метильной группы в хлорофилле *a*.

Указанные хлорофиллы – очень эффективные фоторецепторы, поскольку они содержат сеть чередующихся одинарных

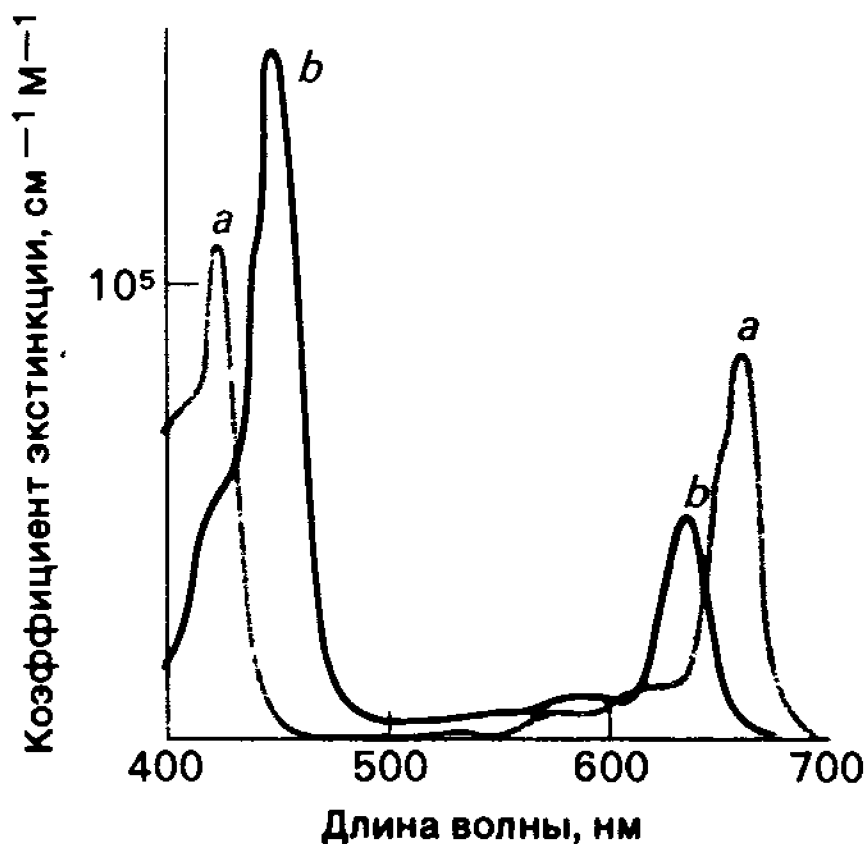


Рис. 19.4. Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b*.

и двойных связей. Другими словами, они представляют собой *полиены*. Они сильно поглощают в видимой части спектра, соответствующей максимуму достигающего Земли солнечного излучения. Пиковые величины коэффициентов экстинкции хлорофиллов *a* и *b* превышают 10^{15} см$^{-1}\cdot$м$^{-1}$ и находятся в ряду самых высоких значений этих коэффициентов, известных для органических соединений.

Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b* различны (рис. 19.4). Свет, который не поглощается в заметной степени хлорофиллом *a*, например, при 460 нм, улавливается хлорофиллом *b*, который обладает интенсивным поглощением именно при этой длине волны. Таким образом, *два вида хлорофилла дополняют друг друга в поглощении солнечного света*. В то же время имеется большая область спектра, от 500 до 600 нм, в которой поглощение света происходит относительно слабо. Большинство растений, однако, не нуждается в улавливании света в этой области спектра, так как для них достаточно света, поглощаемого в синей и красной частях спектра.

19.3. Первичные события фотосинтеза происходят в высокоорганизованной системе мембран

Хлоропласты, органеллы фотосинтеза, обычно достигают в длину 5 мкм. Подобно митохондрии, хлоропласт имеет наружную и внутреннюю мембраны с межмембранным пространством между ними (рис. 19.5). Внутренняя мембрана окружает *строму*, содержащую растворимые ферменты и мембранные структуры, называемые *тилакоидами*, которые представляют собою уплощенные мешочки. Стопки таких мешочков образуют граны. Различные граны соединяются между собою участками мембраны, называемыми stroma lamellae. Мембраны тилакоидов отделяют полость тилакоидов от полости стромы. Таким образом, в хлоропластах имеются три вида мембран *(наружная, внутренняя и тилакоидная)* и три отдельные полости *(межмембранное пространство, полость стромы и полость тилакоидов)*. В развивающихся хлоропластах тилакоиды возникают из впячиваний во внутренней мембране, и, следовательно, они аналогичны митохондриальным кристам.

Мембраны тилакоидов содержат молекулы хлорофилла и другие компоненты преобразующего энергию механизма. Количество липидов и белков примерно одинаково. Липидный состав совершенно определенный: около 40% общего количества липидов составляют *галактолипиды*, 4% – *сульфолипиды*, тогда как на *фосфолипиды* приходится всего 10%. Мембрана тилакоидов, подобно внутренней митохондриальной мембране, непроницаема для большинства молекул и ионов. В строме присутствуют растворимые ферменты, которые используют синтезируемые тилакоидами NADPH и ATP для превращения CO_2 в сахар. В хлоропластах имеются собственная ДНК (разд. 29.9) и механизм для синтеза РНК и белка. Таким образом, *хлоропласт представляет собою органеллу, обладающую значительной автономией*. Внутренняя мембрана хлоропласта, содержащая транслокаторы для ряда соединений, таких, как ATP и дикарбоновые кислоты, служит местом взаимодействия между хлоропластом и остальной частью клетки. Наружная мембрана хлоропласта, как и таковая митохондрии, обладает высокой проницаемостью для небольших молекул и ионов.

19.4. Фотосинтетическая единица: фотоны стекаются в реакционный центр

При измерении скорости фотосинтеза как функции интенсивности освещения оказывается, что она линейно возрастает при низ-

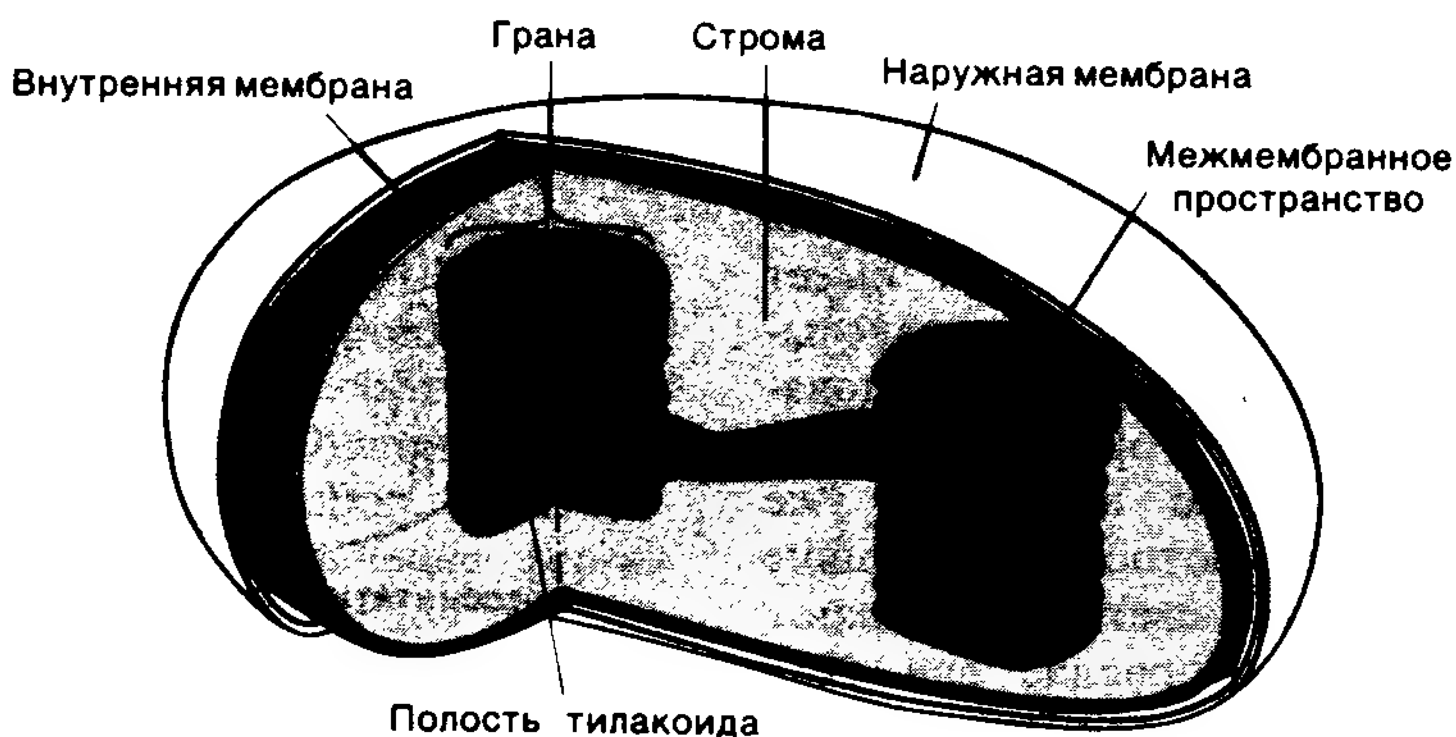


Рис. 19.5. Схематическое изображение хлоропласта. (Wolfe Stephen L., Biology of the Cell, 1972. Wadsworth Publishing Company, Inc.)

ких значениях интенсивности и достигает насыщающей величины при ее высоких значениях (рис. 19.6). Насыщающая величина отмечается в условиях сильного освещения, поскольку химические реакции использования поглощенных фотонов лимитируют скорость процесса. Таким образом, *фотосинтез можно подразделить на световые и темновые реакции.* Как будет вскоре указано, световые реакции генерируют NADPH и ATP, а в темновых реакциях эти богатые энергией молекулы используются для восстановления CO_2.

В 1932 г. Роберт Эмерсон и Уильям Арнольд (Robert Emerson, William Arnold) измерили выход кислорода при фотосинтезе в условиях, когда на клетки *Chlorella* воздействовали световыми вспышками длительностью в несколько микросекунд. Они предполагали, что выход фотосинтеза на вспышку будет увеличиваться с усилением интенсивности вспышки до тех пор, пока каждая молекула хлорофилла не поглотит фотон, который будет затем использован в темновых реакциях. Результат эксперимента был совершенно неожиданным: насыщающая световая вспышка приводила к образованию только одной молекулы O_2 на каждые 2500 молекул хлорофилла.

В результате этих исследований была постулирована концепция *фотосинтетической единицы*. Ганс Гаффрон (Hans Gaffron) предположил, что свет поглощается сотнями молекул хлорофилла, которые затем переносят свою энергию возбуждения к тому месту, где протекают химические реакции (рис. 19.7). Это место называется *реакционным центром*. Таким образом, функция большинства молекул хлорофилла в фотосинтетической единице состоит в поглощении света. Только малая доля хлорофиллов, те, которые локализованы в реакционных центрах, участвует в преобразовании света в химическую энергию. Хлорофиллы в реакционном центре химически идентичны другим хлорофиллам фотосинтетической единицы, но обладают особыми свойствами, обусловленными их особым окружением. Одно из различий состоит в том, что энергетический уровень возбужденного состояния хлорофиллов реакционного центра ниже, чем у других хлорофиллов, и они поэтому способны улавливать энергию. Энергия, поглощенная молекулами хлорофилла, перемещается по фотосинтетической единице, пока не достигнет хлорофилла реакционного центра. Перенос энергии к реакционному центру идет очень быстро, занимая менее 10^{-10} с.

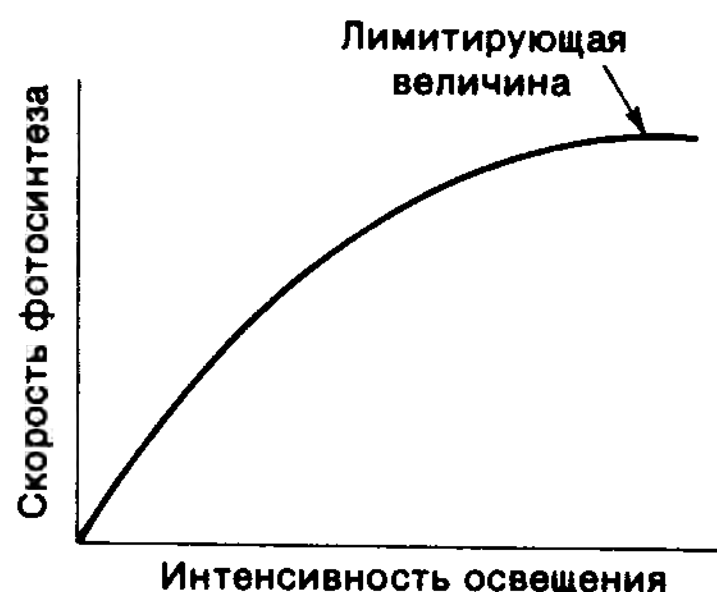
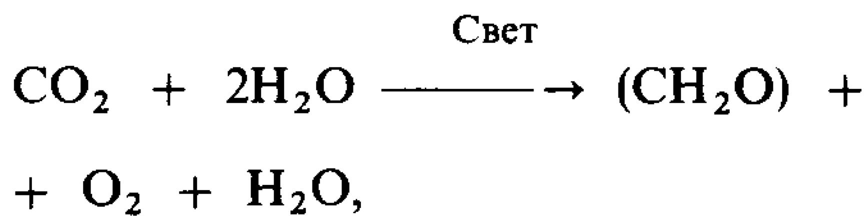


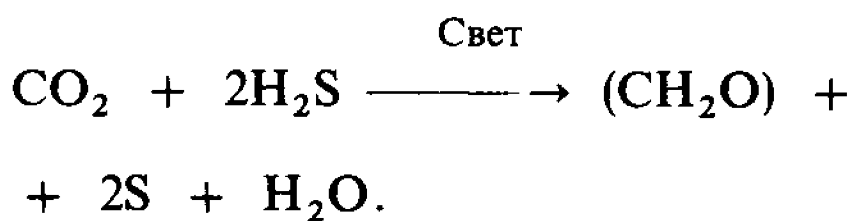
Рис. 19.6. Скорость фотосинтеза достигает лимитирующей величины, когда интенсивность освещения достаточна для возбуждения только небольшой доли молекул хлорофилла.

19.5. Кислород, выделяющийся при фотосинтезе, происходит из воды

Обратимся теперь к химическим изменениям при фотосинтезе. Важное значение для выяснения механизма фотосинтеза имеет источник кислорода, выделяемого зелеными растениями. Сравнительные исследования фотосинтеза у многих организмов привели к открытию этого источника уже в 1931 г. Некоторые фотосинтезирующие бактерии в присутствии света превращают сероводород в серу. Корнелис ван Нил (Cornelis Van Niel) обнаружил, что реакции фотосинтеза у зеленых растений и зеленых серных бактерий очень сходны:

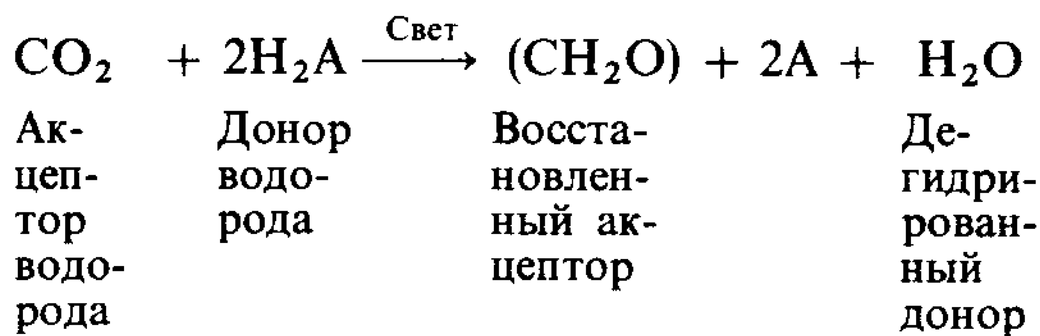


$$CO_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + O_2 + H_2O,$$



$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + 2S + H_2O.$$

Сера, образуемая фотосинтезирующими бактериями, аналогична кислороду, который выделяется растениями. Ван Нил предложил общую формулу для фотосинтеза:



$$CO_2 + 2H_2A \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + 2A + H_2O$$

CO_2	$2H_2A$	(CH_2O)	H_2O
Акцептор водорода	Донор водорода	Восстановленный акцептор	Дегидрированный донор

Донором водорода H_2A у зеленых растений является H_2O, у фотосинтезирующих серных бактерий – H_2S. Таким образом, фотосинтез у зеленых растений может быть сформулирован как реакция восстановления CO_2 водородом, происходящим из воды. Выделение кислорода будет тогда необходимым следствием этого процесса дегидрирования. Суть такого взгляда на фотосинтез может быть выражена следующим образом: *вода расщепляется светом.*

В 1941 г. стал доступен тяжелый изотоп кислорода, ^{18}O, в связи с чем появилась возможность прямо проверить это положение. Действительно, при проведении фотосинтеза в воде, обогащенной ^{18}O, этот изотоп обнаруживался в выделяемом кислороде. Полученный результат подтвердил предположение о том, что O_2, образующийся при фотосинтезе, происходит из воды.



$$H_2{}^{18}O + CO_2 \xrightarrow{\text{Свет}} (CH_2O) + {}^{18}O_2$$

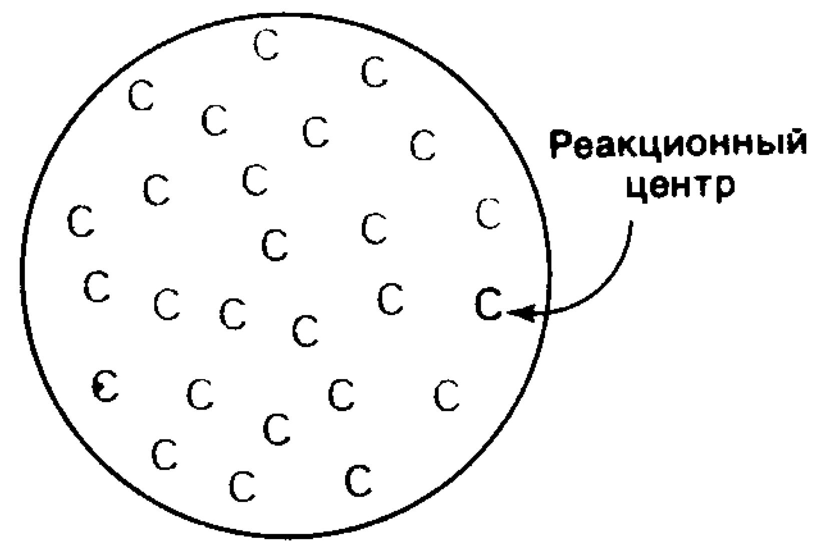


Рис. 19.7. Схема фотосинтетической единицы. Молекулы хлорофилла антенн (обозначенные синими буквами С) переносят свою энергию возбуждения на специализированный хлорофилл в реакционном центре (обозначенный красной буквой С).

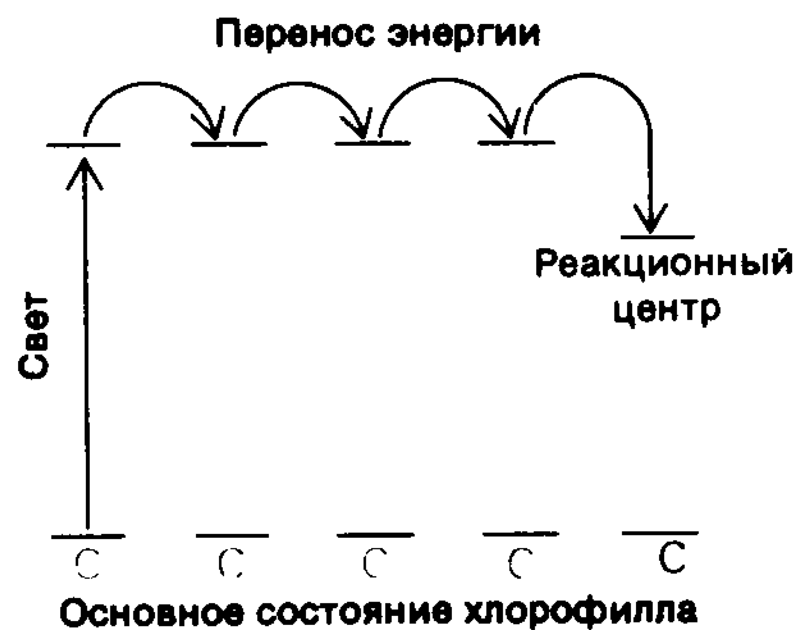
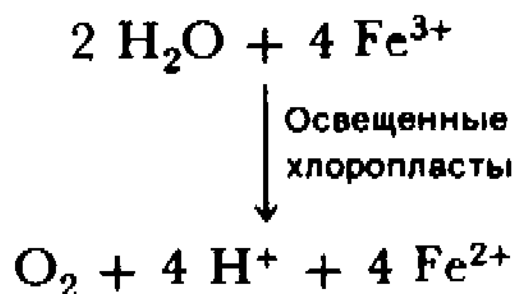


Рис. 19.8. Схематическое изображение энергетических уровней для возбужденного состояния хлорофиллов антенн и реакционного центра.

19.6. Реакция Хилла: освещенные протопласты выделяют кислород и восстанавливают искусственный акцептор электронов

В 1939 г. Роберт Хилл (Robert Hill) обнаружил, что изолированные хлоропласты при их облучении в присутствии соответствующего акцептора электронов, например феррицианида, выделяют кислород. Одновременно происходит восстановление феррицианида в ферроцианид. Реакция Хилла – это поворотный пункт в раскрытии механизма фотосинтеза по следующим причинам:



1. Она раскрыла сущность фотосинтеза, показав, что выделение кислорода может протекать без восстановления CO_2. CO_2 может быть заменен искусственными акцепторами электронов, такими, как феррицианид.

2. Она подтвердила, что выделившийся кислород происходит из воды, а не из CO_2, поскольку CO_2 в системе не было.

3. Она показала, что изолированные хлоропласты могут осуществлять значительную часть составляющих реакций фотосинтеза.

4. Она открыла, что первичным событием в фотосинтезе является *активированный светом перенос электрона от одного вещества к другому против градиента химического потенциала.* Восстановление ферри-иона в ферро-ион под действием света представляет собою превращение света в химическую энергию.

19.7. Фотосинтез требует взаимодействия двух видов фотосистем

В результате многочисленных экспериментальных исследований было установлено, что в хлоропластах имеются две различные фотосистемы. Скорость фотосинтеза исследовалась как функция длины световой волны. Скорость фотосинтеза, разделенная на количество квантов при каждой длине волны, дает относительную квантовую эффективность процесса. Для единичного фоторецептора квантовая эффективность должна быть независимой от длины волны за пределами его полосы поглощения. Эта закономерность не имеет места при фотосинтезе:

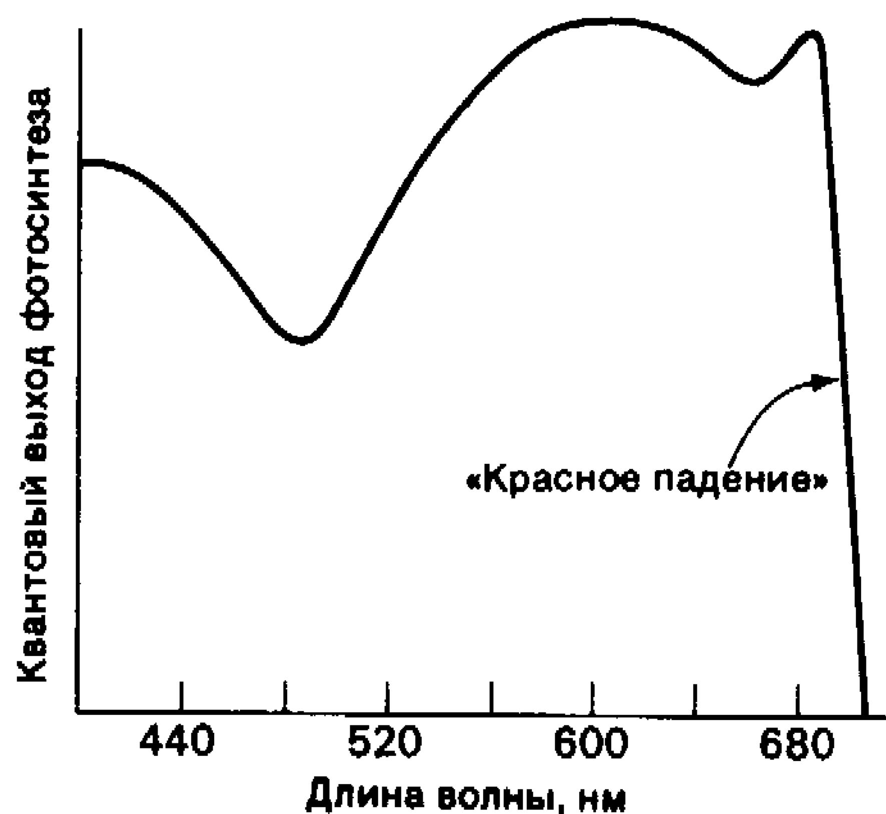


Рис. 19.9. Квантовый выход фотосинтеза резко падает, когда длина возбуждающей световой волны превышает 680 нм.

квантовая эффективность фотосинтеза резко падает при длинах волн, превышающих 680 нм, хотя хлорофилл все еще поглощает свет в диапазоне длин волн от 680 до 700 нм (рис. 19.9). Однако скорость фотосинтеза, протекающего с использованием длинноволнового света, может быть повышена при добавлении света с меньшей длиной волны, например 600 нм. Скорость фотосинтеза в присутствии света с двумя длинами волн – 600 и 700 нм – превышает сумму скоростей этого процесса при воздействии каждой из указанных световых волн в отдельности. Исходя из этих наблюдений, называемых «красным падением», и феномена усиления, Эмерсон (Emerson) высказал предположение, что *фотосинтез требует взаимодействия двух световых реакций: обе они запускаются светом с длиной волны менее 680 нм, но лишь одна из них протекает при свете с большей длиной волны.*

19.8. Роль двух фотосистем

Фотосистема I, которая может быть возбуждена светом с длиной волны менее 700 нм, генерирует сильный восстановитель, приводящий к образованию NADPH. В противоположность ей фотосистема II, требующая присутствия света с длиной волны менее 680 нм, образует сильный окислитель, приводящий к образованию O_2. Кроме того, фотосистема I продуцирует слабый окис-

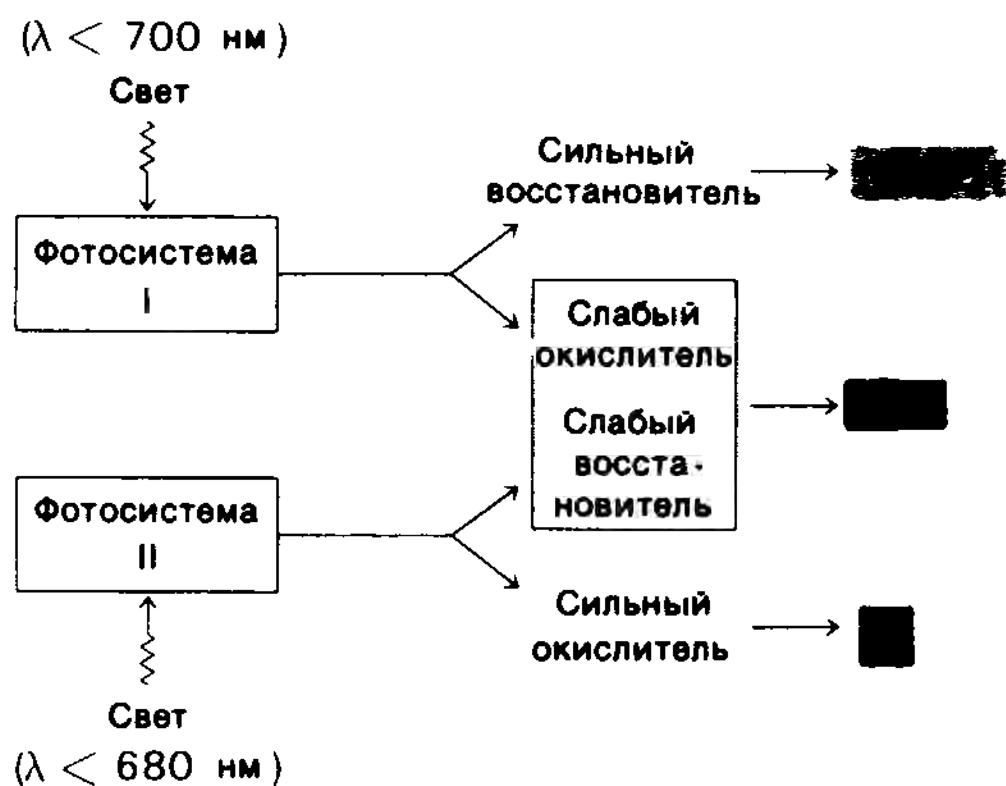


Рис. 19.10. Взаимодействие фотосистем I и II при фотосинтезе.

литель, а фотосистема II – слабый восстановитель. Результатом взаимодействия этих систем является образование ATP. Этот компонент процесса фотосинтеза, открытый Дэниелем Арноном (Daniel Arnon), называется фотосинтетическим фосфорилированием, или *фотофосфорилированием.*

Фотосистемы I и II различаются по своей структуре. При обработке мембран тилакоидов детергентами освобождаются преимущественно частицы, содержащие фотосистему I. Методом центрифугирования в градиенте плотности можно разделить частицы, обладающие только активностью фотосистемы I, и частицы, обогащенные активностью фотосистемы II. Большинство молекул хлорофилла связано со специфическими белками. Из частиц, содержащих фотосистему I, выделен комплекс, состоящий из 14 молекул хлорофилла *a*, связанных с белком 110 кДа. Второй вид комплекса, образованный частицами фотосистемы II, содержит 3 молекулы хлорофилла *a* и 3 молекулы хлорофилла *b*, связанные с белком 28 кДа. Наиболее хорошо охарактеризованный хлорофилл-белковый комплекс, выделенный из зеленых бактерий, состоит из трех субъединиц 50 кДа, каждая из которых содержит семь молекул бактериохлорофилла (рис. 19.11). *Одна из функций белка в этих комплексах заключается в поддержании оптимальной геометрии для переноса энергии между хлорофиллами.*

19.9. Фотосистема I генерирует NADPH через восстановленный ферредоксин

Реакционный центр фотосистемы I (рис. 19.12) – это молекула хлорофилла *a*, находящаяся в специфическом окружении. Его максимум поглощения сдвинут с 680 к 700 нм, исходя из чего он получил название *P700* (где P – пигмент).

Многие молекулы хлорофилла поглощают свет и переносят возбужденную энергию на P700. Возбужденный P700 переносит электрон к *связанному ферредоксину* (P430), связанной с мембраной форме ферредоксина, железосеропротеина типа Fe_4-S_4 с мол. массой 11,6 кДа. В темноте окислительно-восстановительный потенциал P700 равен + 0,4 В. Возбуждение P700 под действием света приводит к изменению распределения электронов со сдвигом окислительно-восстановительного потенциала примерно до – 0,6 В. Таким образом, *свет переводит электрон в фотосистеме I с потенциала около +0,4 В на потенциал –0,6 В.* Энергия красного фотона, составляющая 1,8 эВ (электрон-вольт), достаточна для повышения потенциала электрона на 1,0 В. Перенос возбужденного электрона с P700 на связанный ферредоксин создает дефицит электрона в P700. Для того чтобы P700 мог снова функционировать в качестве реакционного центра, его окисленная форма должна предварительно опять присоединить электрон; чтó служит источником этих

Таблица 19.1. **Состав фотосистем I и II**

Фотосистема I	
~200	Хлорофиллы антенн
~50	Каротиноиды
1	Реакционный центр P700
1	Цитохром c_{552} (*f*)
1	Пластоцианин
2	Цитохром b_{563} (b_6)
1	Связанный ферредоксин
1	Растворимый ферредоксин
1	Ферредоксин-NADP—редуктаза
Фотосистема II	
~200	Хлорофиллы антенн
~50	Каротиноиды
1	Реакционный центр P680
1	Первичный донор электронов (Z)
1	Первичный акцептор электронов (Q)
~4	Пластохинон
6	Атомы марганца
2	Цитохром b_{559}

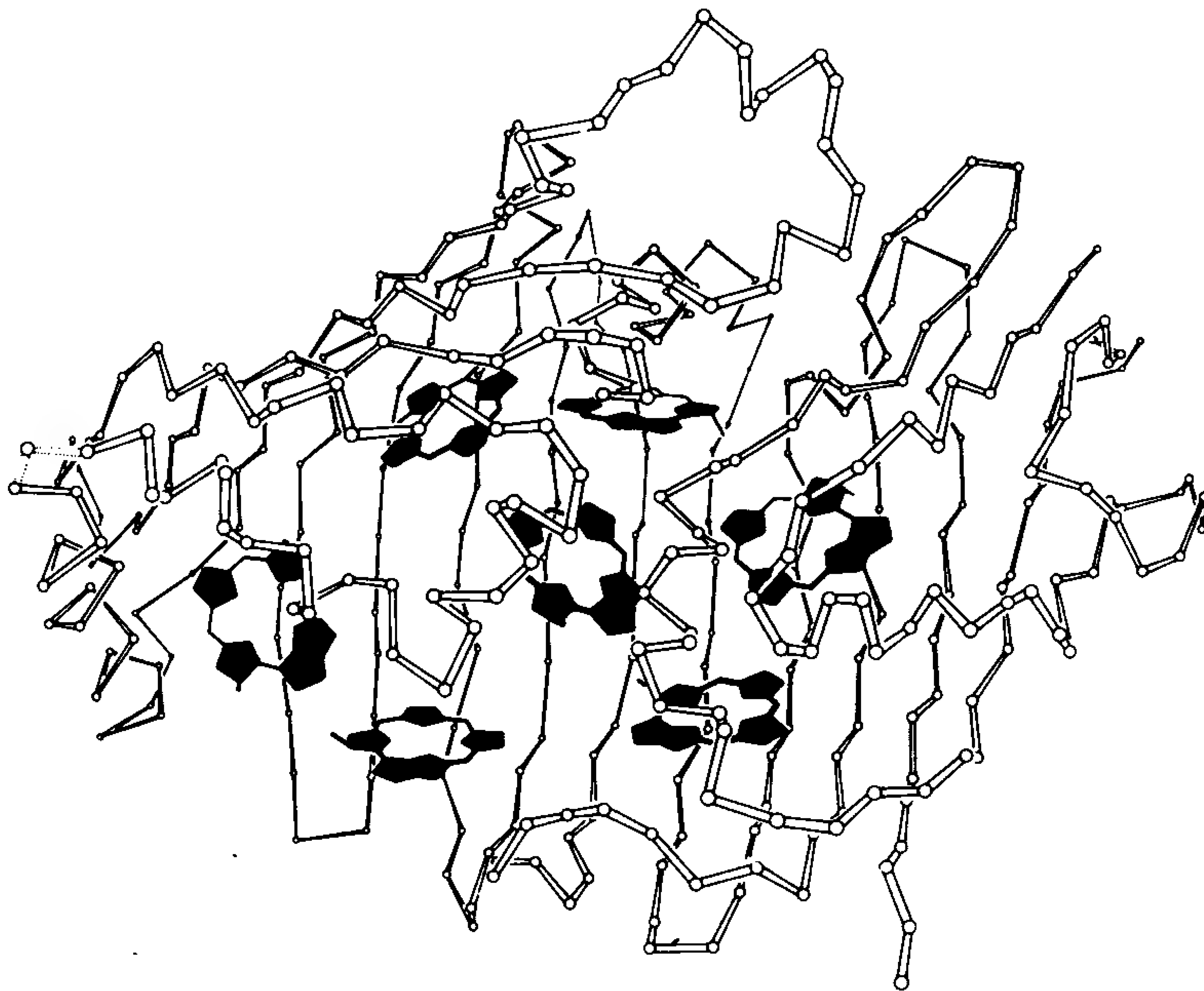


Рис. 19.11. Структура бактериохлорофилл-белкового комплекса из фотосинтезирующей зеленой бактерии. (Печатается с любезного разрешения д-ра Brian Matthews.)

электронов, мы рассмотрим несколько позднее.

Связанный ферредоксин далее переносит свой электрон на растворимую форму ферредоксина. Атом железа в активном центре ферредоксина попеременно окисляется и восстанавливается. Восстановленный ферредоксин переносит свой электрон на $NADP^+$ с образованием NADPH. Реакция катализируется *ферредоксин-NADP—редуктазой*, содержащей FAD в качестве простетической группы. Заметим, что при восстановлении $NADP^+$ в NADPH происходит перенос двух электронов, тогда как ферредоксин является переносчиком одного электрона. Таким образом, электроны от двух восстановленных ферредоксинов должны конвергировать, образуя одну молекулу NADPH.

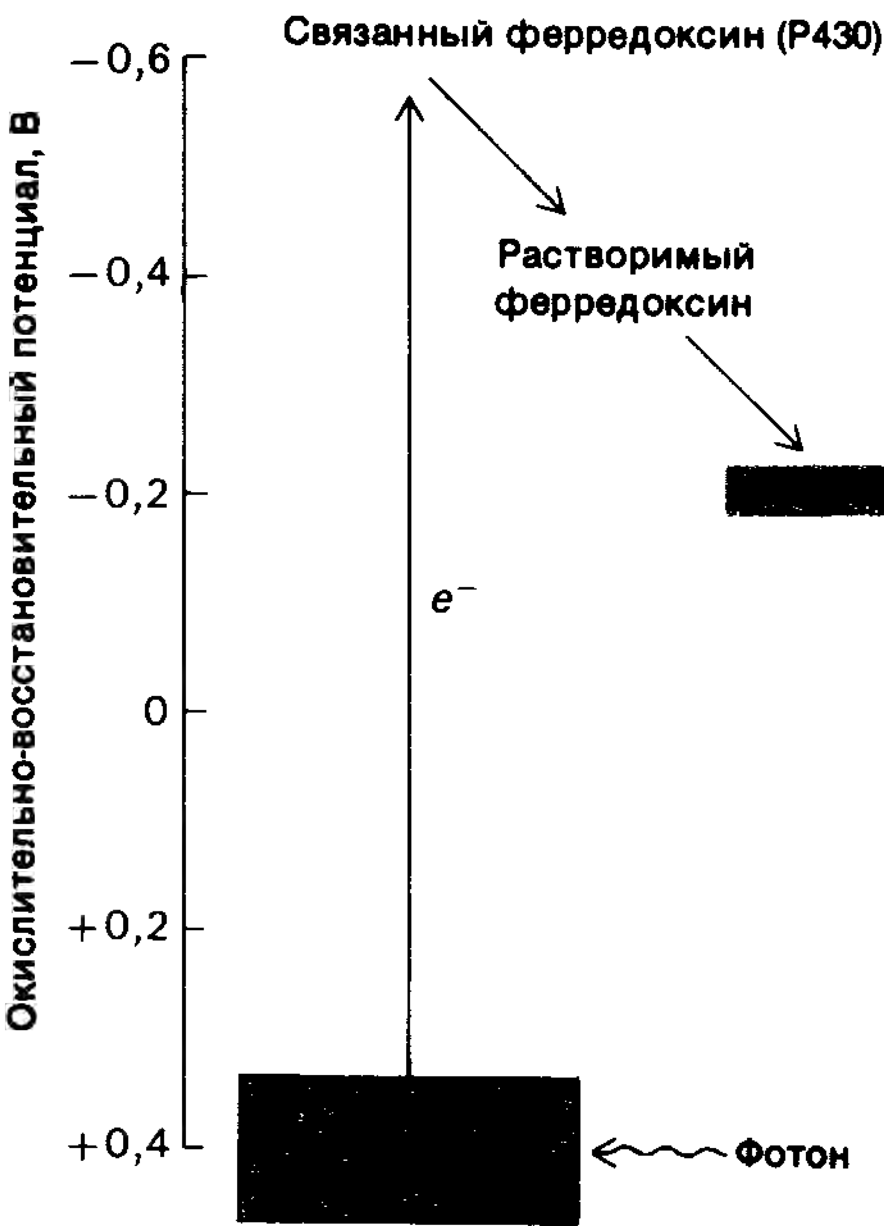
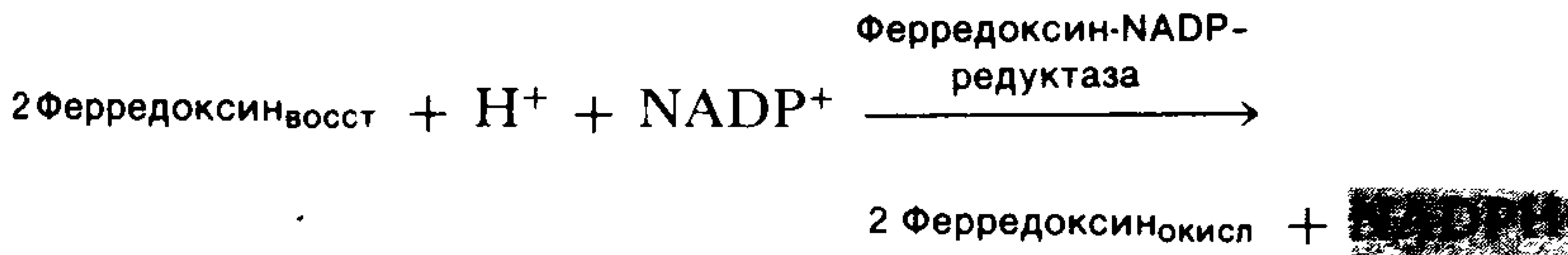


Рис. 19.12. Образование NADPH фотосистемой I.



$$2\,\text{Ферредоксин}_{\text{восст}} + H^+ + NADP^+ \xrightarrow{\text{Ферредоксин-NADP-редуктаза}} 2\,\text{Ферредоксин}_{\text{окисл}} + NADPH$$

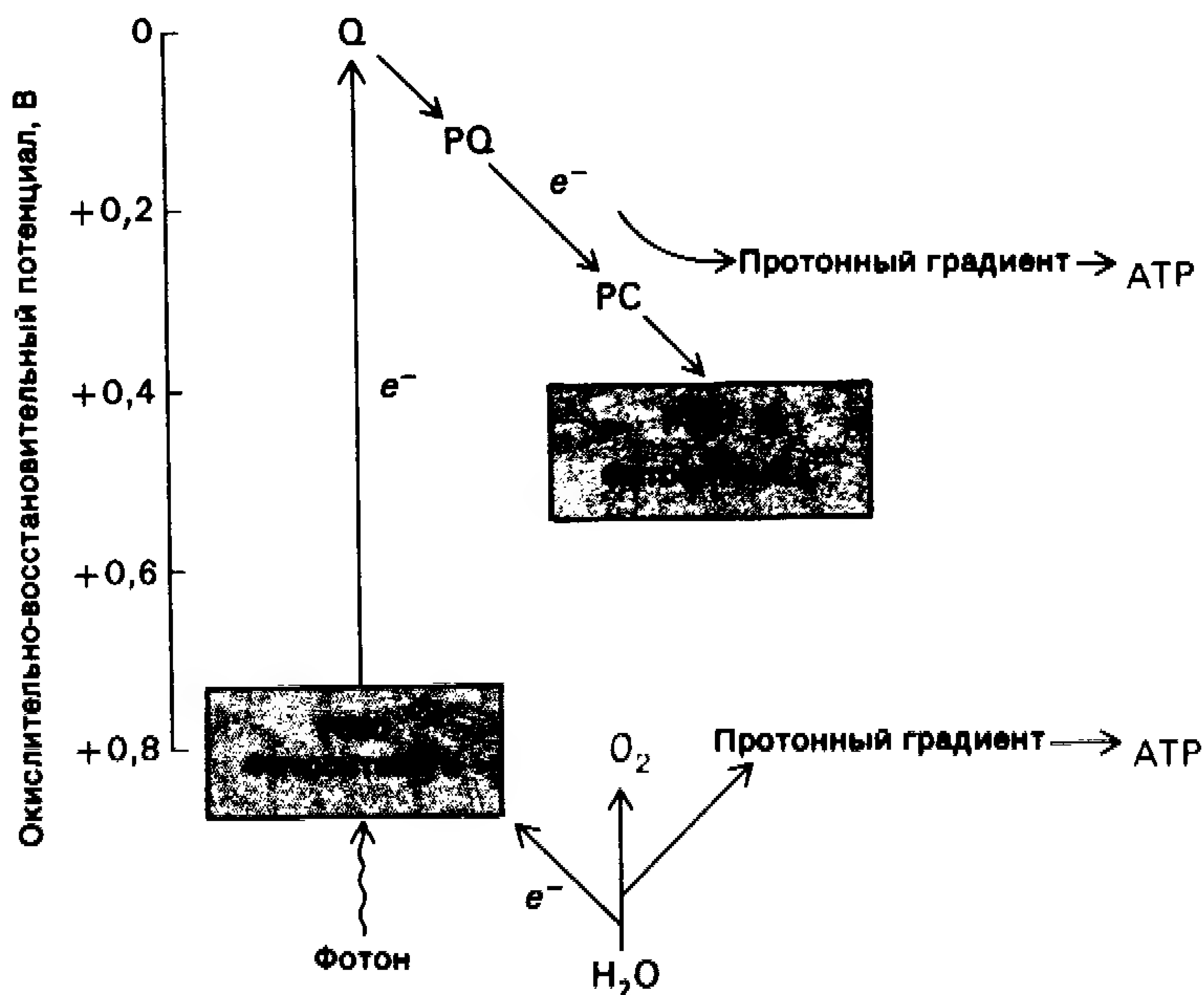


Рис. 19.13. Возбуждение фотосистемы II приводит к образованию O_2 и переносу электрона на фотосистему I. При этих процессах происходит генерирование протонного градиента через мембрану тилакоида (PQ обозначает пластохинон, PC – пластоцианин).

19.10. Фотосистема II генерирует сильный окислитель, который расщепляет воду

О реакционном центре (P680) и первичном акцепторе электрона фотосистемы II (рис. 19.13) известно сравнительно немного. Окислительно-восстановительный потенциал этого реакционного центра – около + 0,8 В.

Под действием света возникает очень сильный окислитель Z^+ (окисленная форма реакционного центра или ее производное) и слабый восстановитель Q^-, локализованный в этом центре. Z^+ извлекает электроны из H_2O с образованием O_2. Существенную роль в этом процессе играет марганец.

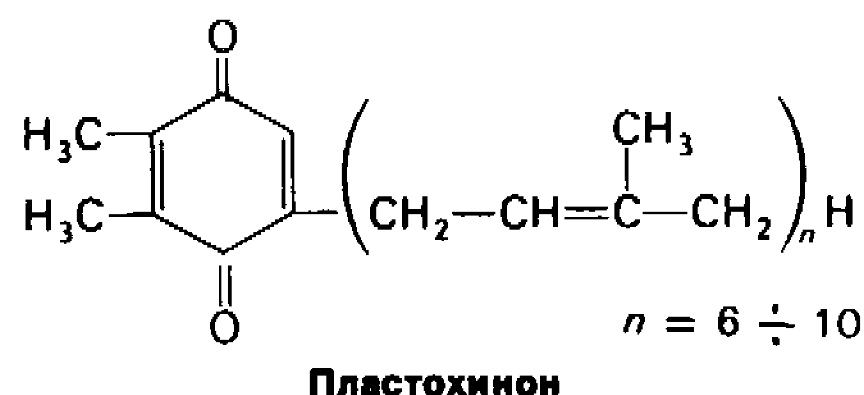


$$4Z^+ + 2H_2O \rightarrow 4Z + 4H^+ + O_2.$$

19.11. При переносе электронов от фотосистемы II к фотосистеме I создается протонный градиент

Фотосистемы I и II связаны между собой рядом электронных переносчиков, которые играют двойную роль.

1. Через это связующее звено электроны переходят от фотосистемы II к фотосистеме I. Эти электроны необходимы для *регенерирования восстановленной формы P700*, реакционного центра фотосистемы I.



Пластохинон

2. При переносе электронов через данное связующее звено создается *протонный градиент* через мембрану тилакоидов. В возникновение этого градиента вносят вклад также протоны, образующиеся при выделении O_2. Реакция среды в полости тилакоидов становится более кислой. Возникающий протонный градиент запускает синтез ATP (разд. 19.13).

Из фотоактивированного реакционного центра фотосистемы II электрон переносится на Q, прочно связанную молекулу *пластохинона*. Этот хинон очень сходен с убихиноном (разд. 14.4), компонентом цепи переноса электронов в митохондриях, и

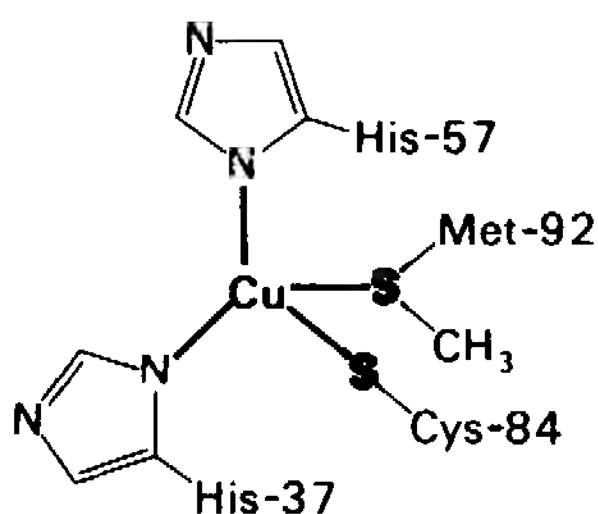
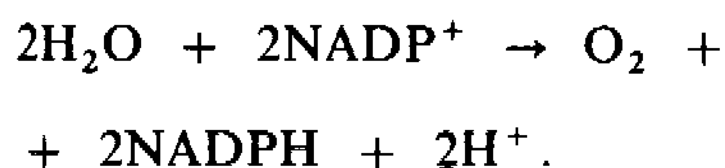


Рис. 19.14. Структура координированного иона меди в пластоцианине.

с витамином К (разд. 11.11). От Q электрон переносится затем к *подвижным пластохинонам* и затем к *цитохрому* b_{559}. Следующий член цепи переноса электронов – *цитохром* c_{552} (ранее называвшийся цитохромом f), представляющий собой в отличие от цитохрома c в митохондриях интегральный мембранный белок. Конечным переносчиком электрона от фотосистемы II к фотосистеме I является *пластоцианин*, представляющий собою белок в 10,5 кДа с одним атомом *меди*, который координационно связан с четырьмя группами: цистеином, метионином и двумя гистидиновыми боковыми цепями (рис. 19.14). Эта пространственная координация отличается от имеющих плоскостной характер низкомолекулярных комплексов Cu^{2+}. Локализованное натяжение при атоме Cu, вероятно, облегчает перенос электрона, поскольку Cu находится попеременно в степени окисления +1 и +2. Атом Cu расположен вблизи поверхности молекулы пластоцианина, он закрыт только гистидиновой боковой цепью, и перенос электронов к Cu может осуществляться посредством прямого механизма (разд. 14.16). Благодаря переносу электрона с восстановленного пластоцианина на окисленную форму P700 реакционный центр вновь может служить донором электронов, образующим NADPH при освещении. Суммарная реакция, протекающая при фотоактивации фотосистем I и II, выглядит следующим образом:



$$2H_2O + 2NADP^+ \rightarrow O_2 + $$
$$+ 2NADPH + 2H^+.$$

Иными словами, *свет вызывает перенос электронов от* H_2O *к NADPH* (рис. 19.15).

19.12. При циклическом переносе электронов через фотосистему I может образовываться также ATP

Существует другой путь переноса электронов, происходящих из P700, реакционного центра фотосистемы I. Электрон с высоким потенциалом в связанном ферредоксине может переноситься не на $NADP^+$, а на цитохром b_{563}. Затем происходит обратный поток этого электрона к осиленной форме P700 через цитохром c_{552} и пластоцианин. Другими словами, имеет место циклический поток электронов. При возвращении электронов в реакционный центр через цитохром b_{563} и пластоцианин происходит генерирование ATP. Поэтому описанный процесс называется *циклическим фотофосфорилированием* (рис. 19.16). При действии этого механизма *генерирование ATP не сопровождается одновременным образованием NADPH*. Фотосистема II не участвует в циклическом фосфорилировании, и, следовательно, образования O_2 из H_2O не происходит. Циклическое фотофосфорилирование активно функционирует, когда содержание NADP оказывается ниже, чем это необходимо для акцептирования электронов от восстановленного ферредоксина. Такое состояние возникает при высоком соотношении [NADPH]/[$NADP^+$].

19.13. Протонный градиент через мембрану тилакоидов запускает синтез ATP

В 1966 г. Андре Ягендорф (André Jagendorf) показал, что хлоропласты синтезируют ATP в темноте при создании искусственного градиента pH через мембрану тилакоидов. Для возникновения такого преходящего градиента pH хлоропасты погружали на несколько часов в буфер с pH 4. Затем хлоропласты быстро смешивали с буфером pH 8, содержащим ADP и P_i. В результате pH стромы моментально возрастал до 8, тогда как pH полости тилакоидов оставался равным 4. *Исчезновение возникшего градиента pH в мембране тилакоидов сопровождалось вспышкой синтеза ATP* (рис. 19.17). Этот показательный эксперимент представляет собою сильный аргумент в пользу хемиосмотической гипотезы синтеза ATP (разд. 14.5).

Действительно, механизм синтеза ATP в хлоропластах весьма близок к таковому

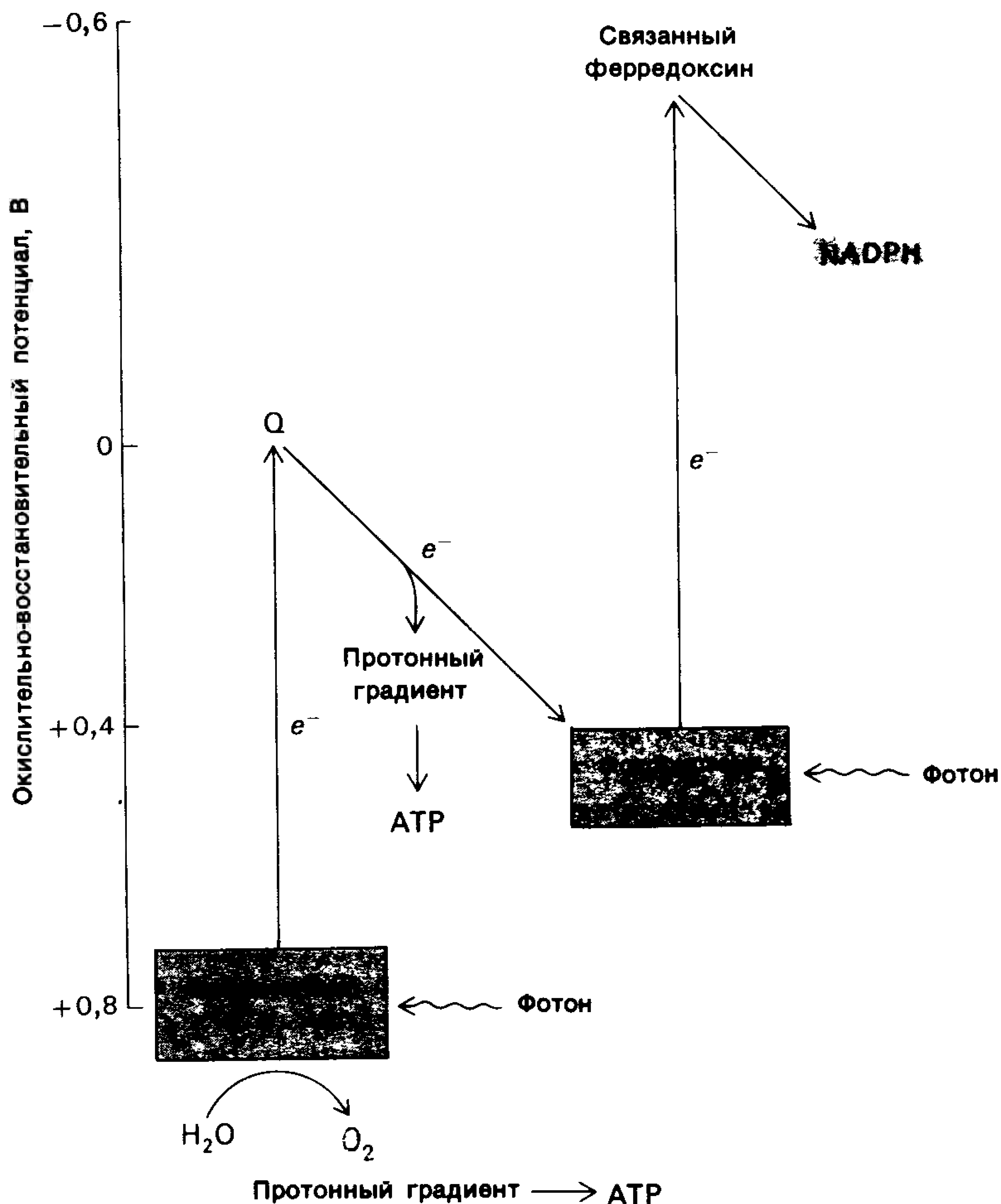


Рис. 19.15. Поток электронов при нециклическом фотофосфорилировании. Это истинный поток электрона от H_2O к $NADP^+$ с образованием NADPH.

в митохондриях. *И при фотофосфорилировании, и при окислительном фосфорилировании образование ATP запускается протонодвижущей силой.* Кроме того, ферментный ансамбль, катализирующий образование ATP в хлоропластах, называемый *комплексом* CF_1—CF_0 (где C обозначает хлоропласт, а F-фактор), очень сходен с митохондриальным комплексом F_1—F_0. CF_1 катализирует образование ATP из ADP и P_i. Он содержит пары пяти видов субъединиц и имеет массу 325 кДа. CF_0, содержащий протонный канал, состоит из трех видов субъединиц. Выпячивания на наружной поверхности мембраны тилакоидов представляют собою CF_1-компоненты этих ATP-синтезирующих комплексов.

Перенос электрона через асимметрично ориентированные фотосистемы I и II создает большой протонный градиент через мембрану тилакоидов. *Реакция среды в полости тилакоидов становится выраженно кислой — pH приближается к 4. Индуцированный светом трансмембранный протонный градиент составляет примерно 3,5 единицы pH.* Как обсуждалось ранее (разд. 14.5), протонодвижущая сила Δp складывается из градиента pH и мембранного потенциала. В хлоропластах почти вся величина Δp создается градиентом pH, тогда как в митохондриях более значителен вклад мембранного потенциала. Причина этого различия состоит в том, что мембрана тилакоидов полностью проницаема для Cl и Mg^{2+}. Индуцируемый светом перенос H^+ в полость тилакоидов сопровождается или

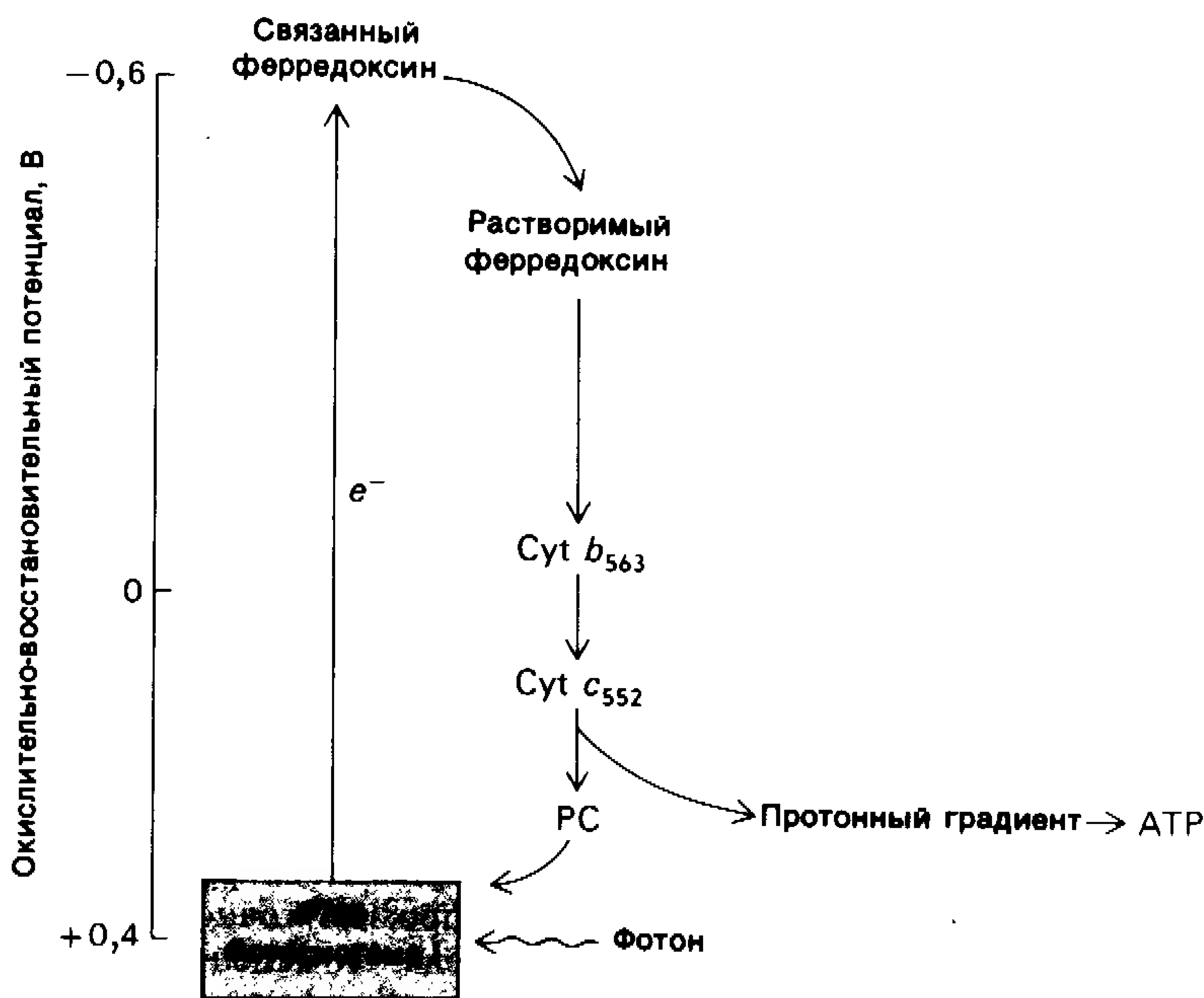


Рис. 19.16. Поток электронов при циклическом фотофосфорилировании. Поглощение фотона сопровождается переносом электронов с P700, реакционного центра фотосистемы I, на связанный ферредоксин. Электроны возвращаются на P700.

переносом Cl^- в том же направлении, или переносом Mg^{2+} (одного на $2H^+$) в противоположном направлении. Таким образом, при этом поддерживается электронейтральность и не происходит генерирования мембранного потенциала. Протонодвижущая сила через мембрану тилакоидов, равная 0,2 В, эквивалентна примерно 4,8 ккал на моль протонов. *На одну молекулу синтезируемого ATP через комплекс CF_1—CF_0 протекает около трех протонов, что соответствует потреблению свободной энергии в количестве 14,4 ккал в расчете на моль ATP.* Когда градиент pH меньше двух единиц, синтеза ATP не происходит, потому что при этом слишком мала движущая сила.

CF_1 находится на обращенной к строме поверхности мембраны тилакоидов, и, следовательно, синтезированный ATP высвобождается в полость стромы. Подобно этому высвобождается в полость стромы и NADPH, образованный фотосистемой I. Таким образом, *ATP и NADPH, продукты световых реакций фотосинтеза, локализованы таким образом, чтобы обеспечить последующие темновые реакции, в ходе которых происходит превращение CO_2 в углеводы.*

19.14. Исследование пути углерода с использованием импульсной радиоактивной метки

В 1945 г. Мелвин Кальвин (Melvin Calvin) и его сотрудники начали серию исследований, проливших свет на темновые реакции фотосинтеза. Они использовали в своей работе одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella*, поскольку этот организм легко и с высокой воспроизводимостью культивируется. Позднее оказалось, что полученные ими результаты могут быть распространены на большое множество фотосинтезирующих организмов, от фотосинтезирующих бактерий до высших растений.

Целью предпринятой ими работы было выяснение пути, обеспечивающего фиксацию CO_2 с образованием углевода. Стратегия эксперимента состояла в том, чтобы, используя метку ^{14}C, проследить превращения CO_2. Радиоактивный $^{14}CO_2$ вводили в освещаемую суспензию водоросли, в которой протекал фотосинтез с использованием обычного CO_2. По прошествии определенного времени водоросль убивали, вливая

13-31

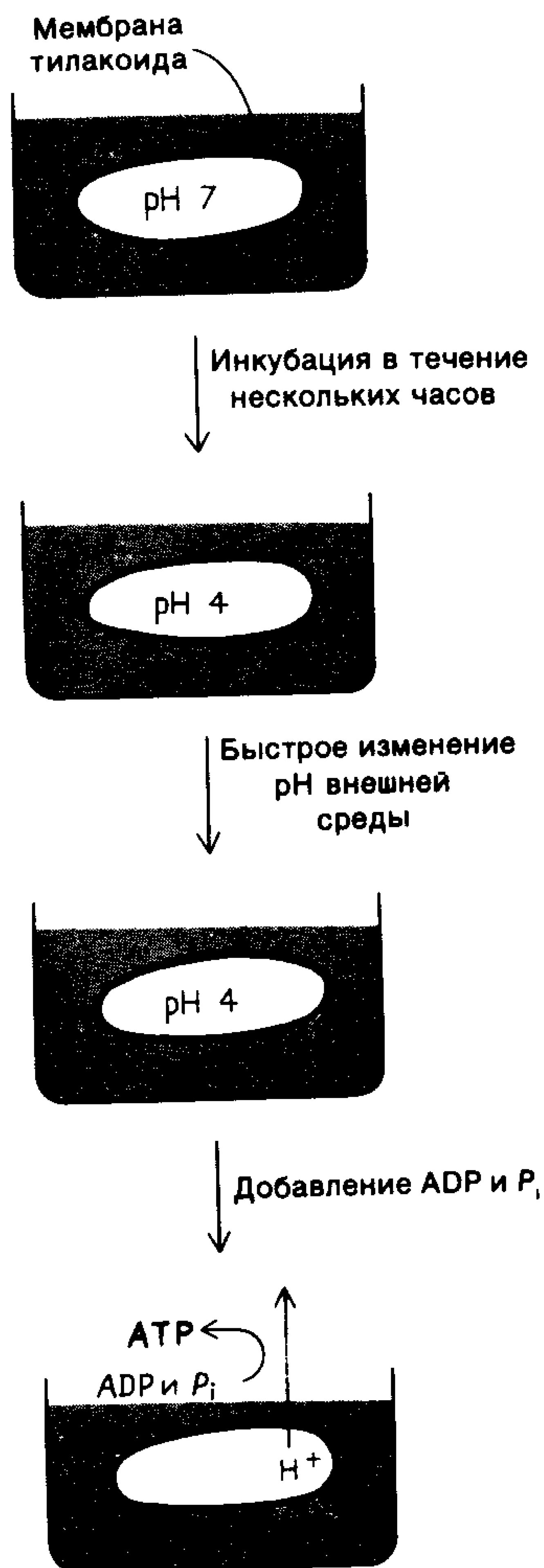


Рис. 19.17. Синтез АТР хлоропластами при наличии градиента pH.

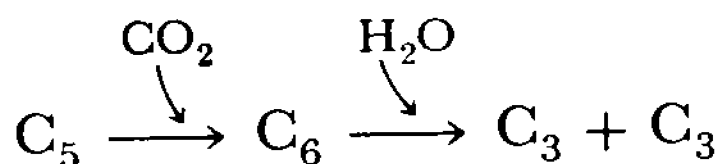
суспензию в спирт, что блокировало все ферментативные реакции.

Радиоактивные соединения водоросли разделяли и идентифицировали методом двухмерной хроматографии на бумаге. Бумажные хроматограммы помещали затем под пресс вместе с фотопленкой, которая чернела в тех местах, где на бумаге находилось радиоактивное пятно. В своей Нобелевской лекции Кальвин отметил, что их первоначальные данные относились «к количеству, положению и интенсивности обусловленных радиоактивностью почерневших участков. К сожалению, бумага сама не печатает названия этих соединений, и в течение последующих десяти лет наше основное занятие состояло в том, чтобы правильно определить природу соединений на этих почерневших участках пленки».

19.15. CO_2 реагирует с рибулозобисфосфатом с образованием двух фосфоглицератов

Радиохроматограмма, получаемая после 60 с освещения, оказалась настолько сложной (рис. 19.19), что на ней невозможно было отличить самый ранний промежуточный продукт в процессе фиксации CO_2. Однако после освещения в течение всего лишь 5 с картина была значительно проще: на хроматограмме присутствовало только одно явное радиоактивное пятно, которое оказалось *3-фосфоглицератом.*

Образование 3-фосфоглицерата в качестве первого обнаруживаемого радиоактивного промежуточного продукта наводило на мысль, что акцептором CO_2 служит двухуглеродное соединение. Оказалось, что это не так. Действительная последовательность реакций гораздо сложнее:



$$C_5 \xrightarrow{CO_2} C_6 \xrightarrow{H_2O} C_3 + C_3$$

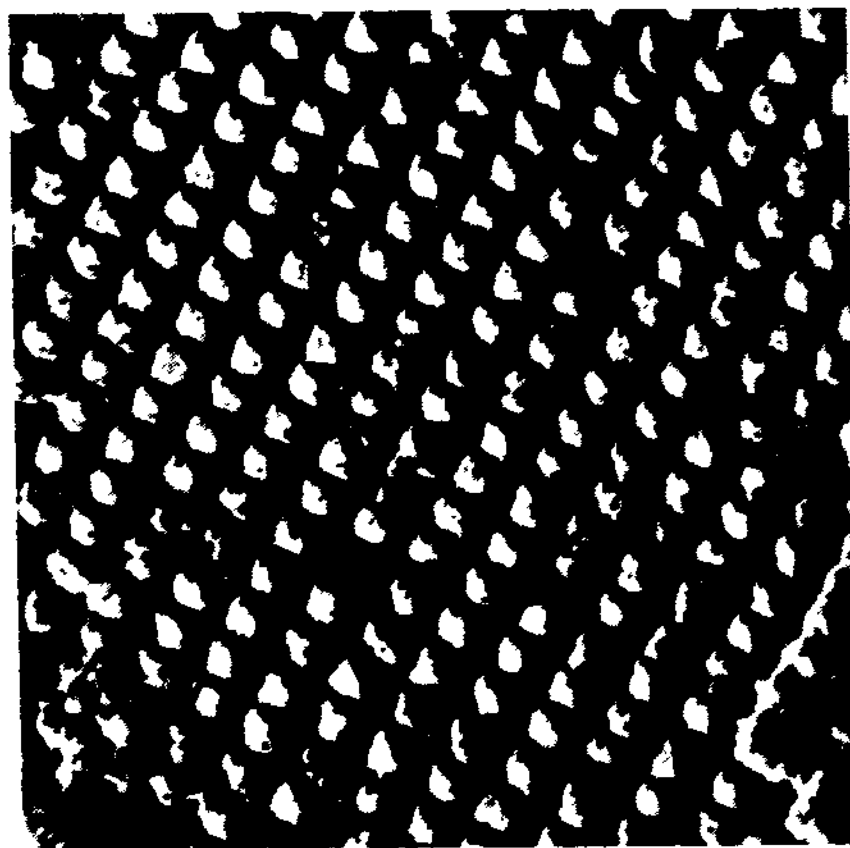
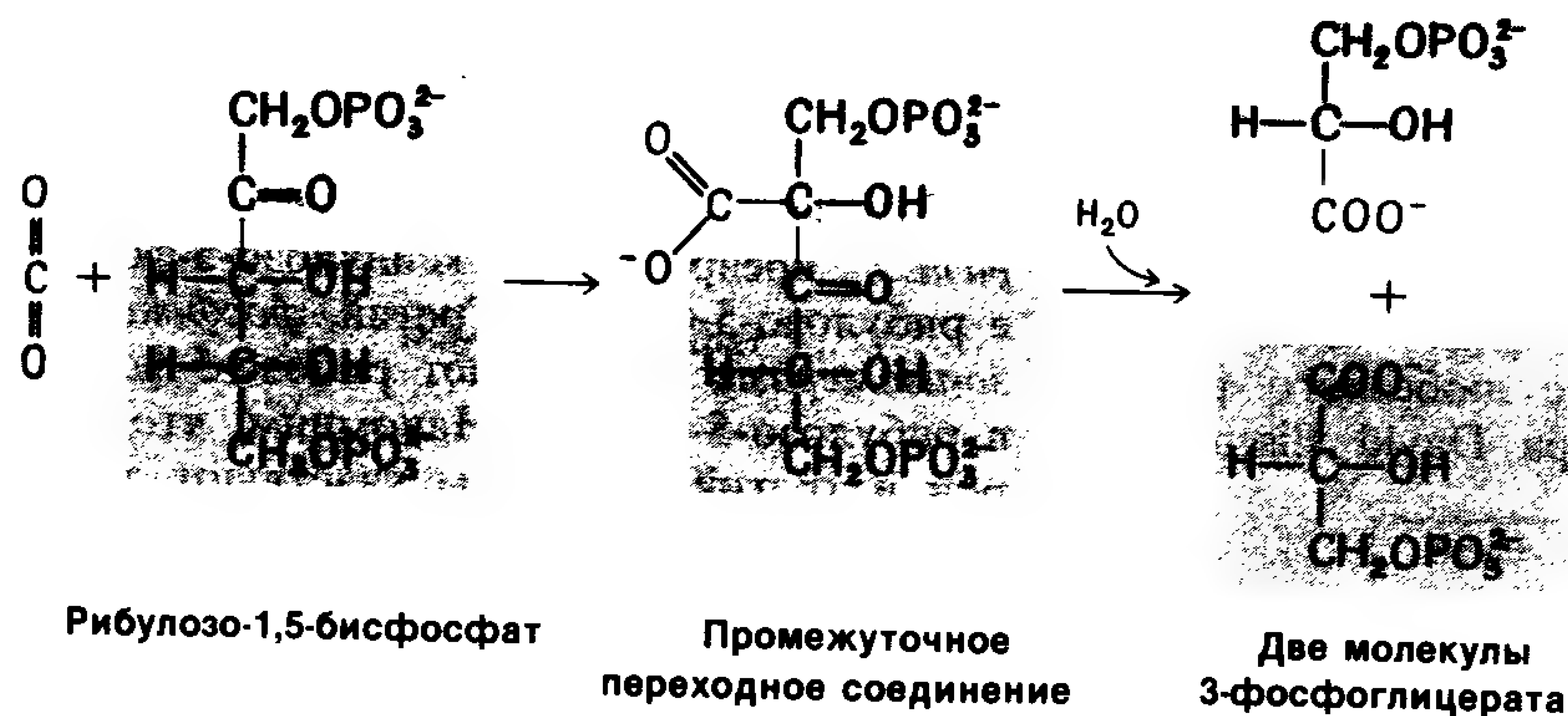




Рис. 19.18. Электронная микрофотография мембран тилакоидов шпината, полученная методом замораживания – скалывания. Видна правильная решетка трансмембранных частиц. (Печатается с любезного разрешения д-ра Kenneth Miller.)

Молекула CO_2 конденсируется с рибулозо-1,5-бисдифосфатом с образованием короткоживущего шестиуглеродного соединения, которое быстро гидролизуется до двух молекул 3-фосфоглицерата. Суммарная реакция носит высокоэкзергонический характер ($\Delta G^{0'}$ = 12,4 ккал/моль).

сахара из шестиуглеродного и трехуглеродного сахаров. Оно осуществляется в ходе реакций, катализируемых *транскетолазой* и *альдолазой*. Транскетолаза участвует также в превращениях по пентозофосфатному пути (разд. 15.4). Напомним, что транскетолаза, фермент, использующий в качестве



Реакция катализируется *рибулозо-1,5-бисфосфат—карбоксилазой*, которая локализована на обращенной к строме поверхности мембран тилакоидов. Этим ферментом очень богаты хлоропласты; на его долю приходится более 16% общего содержания в них белка. Рибулозо-1,5-бисфосфат—карбоксилаза, вероятно, является белком, содержащимся в биосфере в наибольшем количестве. Он состоит из восьми больших (55 кДа) и восьми малых (15 кДа) субъединиц, расположенных в виде двух слоев (рис. 19.20). Большие субъединицы каталитически активны и в отсутствие малых субъединиц, которые выполняют регуляторную роль. Фермент является в одно и то же время и оксигеназой (разд. 19.20), и карбоксилазой.

19.16. Образование фруктозо-6-фосфата и регенерирование рибулозо-1,5-бисфосфата

Этапы превращения 3-фосфоглицерата во фруктозо-6-фосфат (рис. 19.21) подобны таковым в пути глюконеогенеза (разд. 15.13) с той лишь разницей, что глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа хлоропластов специфична в отношении NADPH, а не NADH. В результате этих реакций CO_2 переходит на уровень гексозы. Остается лишь регенерировать рибулозобисфосфат, акцептор CO_2 на первой темновой стадии. Проблема сводится к образованию пятиуглеродного

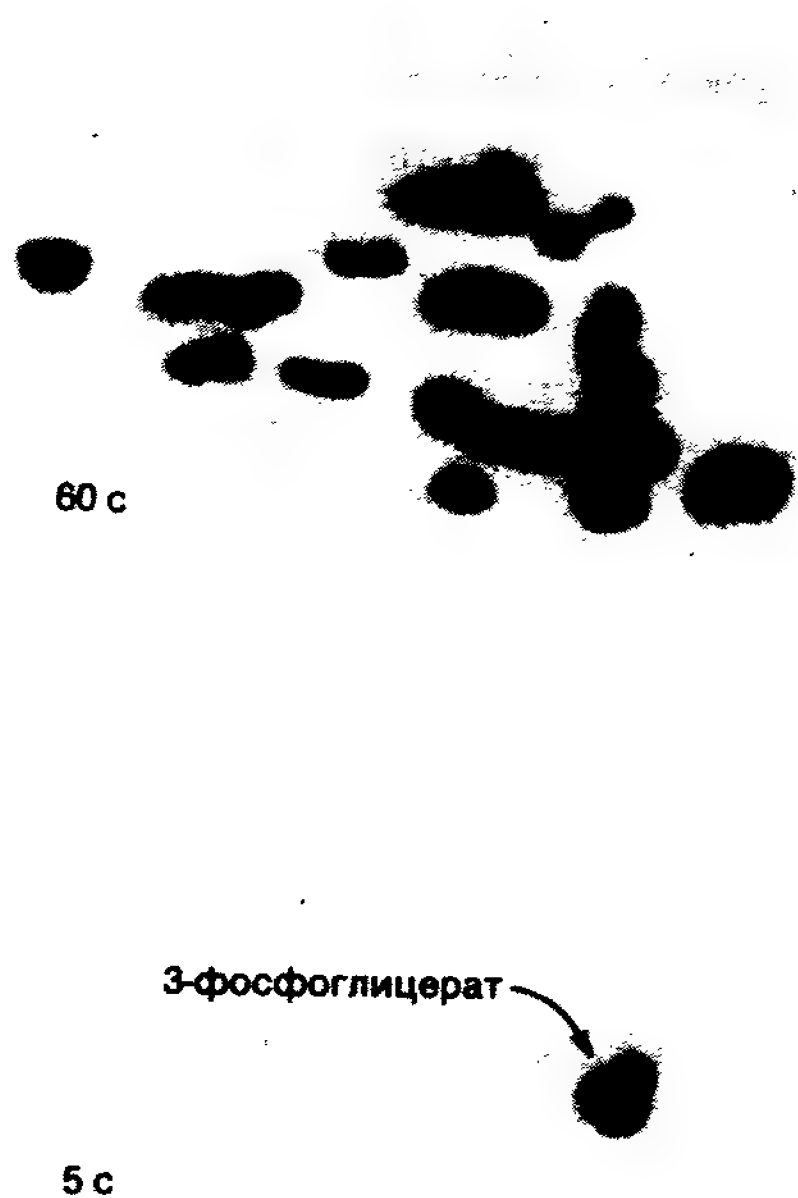


Рис. 19.19. Радиохроматограммы освещенных суспензий водоросли через 5 и 60 с после введения в систему CO_2. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. A. Bassham.)

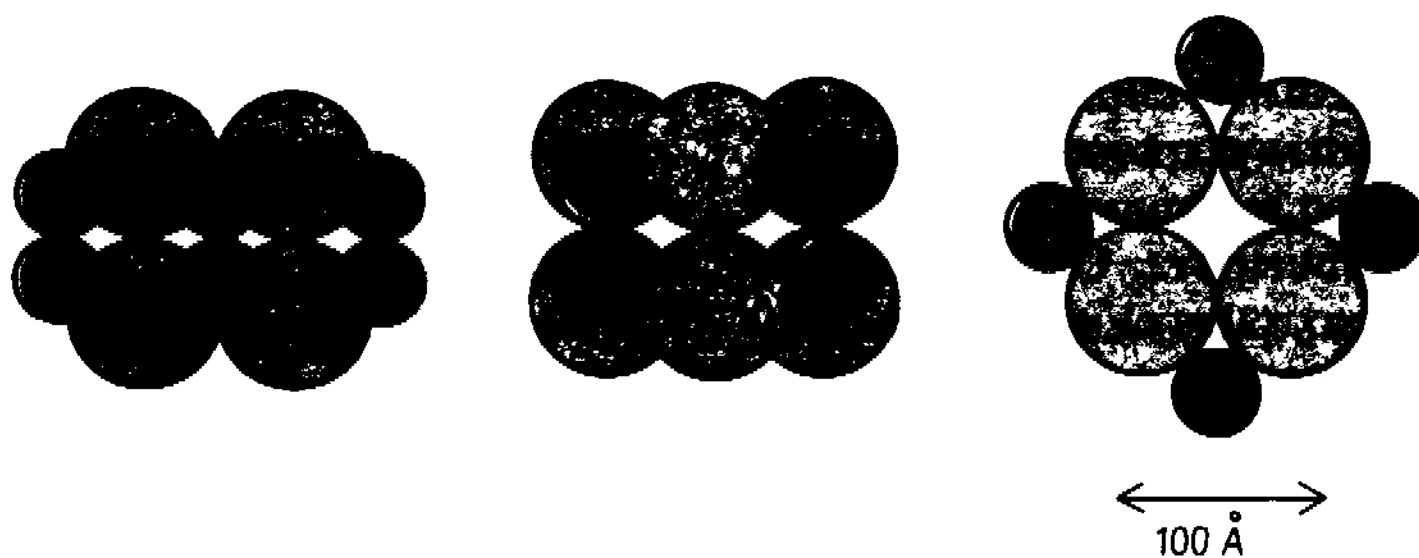


Рис. 19.20. Схематическое изображение структуры рибулозо-1,5-бисфосфат—карбоксилазы. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Eisenberg.)

простетической группы тиаминпирофосфат, переносит двухуглеродный фрагмент (CH_2OH—CO—) с кетозы на альдозу. Альдолаза осуществляет альдольную конденсацию между дигидроксиацетонфосфатом







и альдегидом. Фермент этот высокоспецифичен для дигидроксиацетонфосфата, но реагирует с множеством альдегидов. К специфическим реакциям, катализируемым транскетолазой и альдолазой в цикле Кальвина, относятся следующие:

Фруктозо-6-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат $\xrightarrow{\text{Транскетолаза}}$ Ксилулолозо-5-фосфат + + Эритрозо-4-фосфат.

Эритрозо-4-фосфат + Дигидроксиацетонфосфат $\xrightarrow{\text{Альдолаза}}$ Седогептулозо-1,7-бисфосфат.

Седогептулозо-7-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат $\xrightarrow{\text{Транскетолаза}}$ Рибозо-5-фосфат + Ксилулозо-5-фосфат.

Для темновых реакций фотосинтеза требуются четыре дополнительных фермента. Один из них, *фосфатаза*, гидролизует седогептулозо-1,7-бисфосфат до седогептулозо-7-фосфата. Второй, *фосфопентозо-эпимераза*, превращает ксилулозо-5-фосфат в рибулозо-5-фосфат. Третий, *фосфопентозо-изомераза*, превращает рибозо-5-фосфат в рибулозо-5-фосфат. Напомним, что второй и третий ферменты участвуют также в превращениях по пентозофосфатному пути (разд. 15.4). Суммируя вышеуказанные реакции, получаем

Фруктозо-6-фосфат + 2-глицеральдегид-3-фосфат + Дигидроксиацетонфосфат → 3 Рибулозо-5-фосфат.

Наконец, четвертый фермент, *фосфорибулозокиназа*, катализирует фосфорилирование рибулозо-5-фосфата с регенерированием рибулозо-1,5-бисфосфата, акцептора CO_2.

Рибулозо-5-фосфат + ATP →

→ Рибулозо-1,5-бисфосфат + ADP + H^+.

Эта группа реакций носит название *цикла Кальвина* (рис. 19.22).

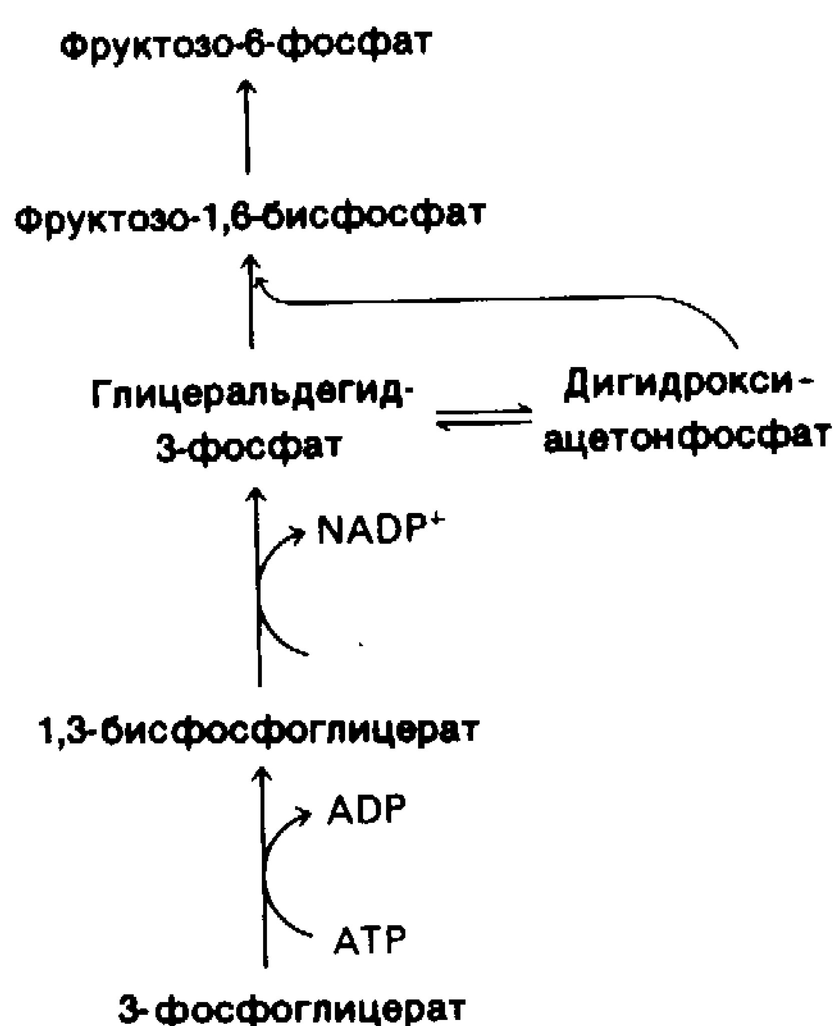


Рис. 19.21. Путь превращения 3-фосфоглицерата во фруктозо-6-фосфат в хлоропластах.

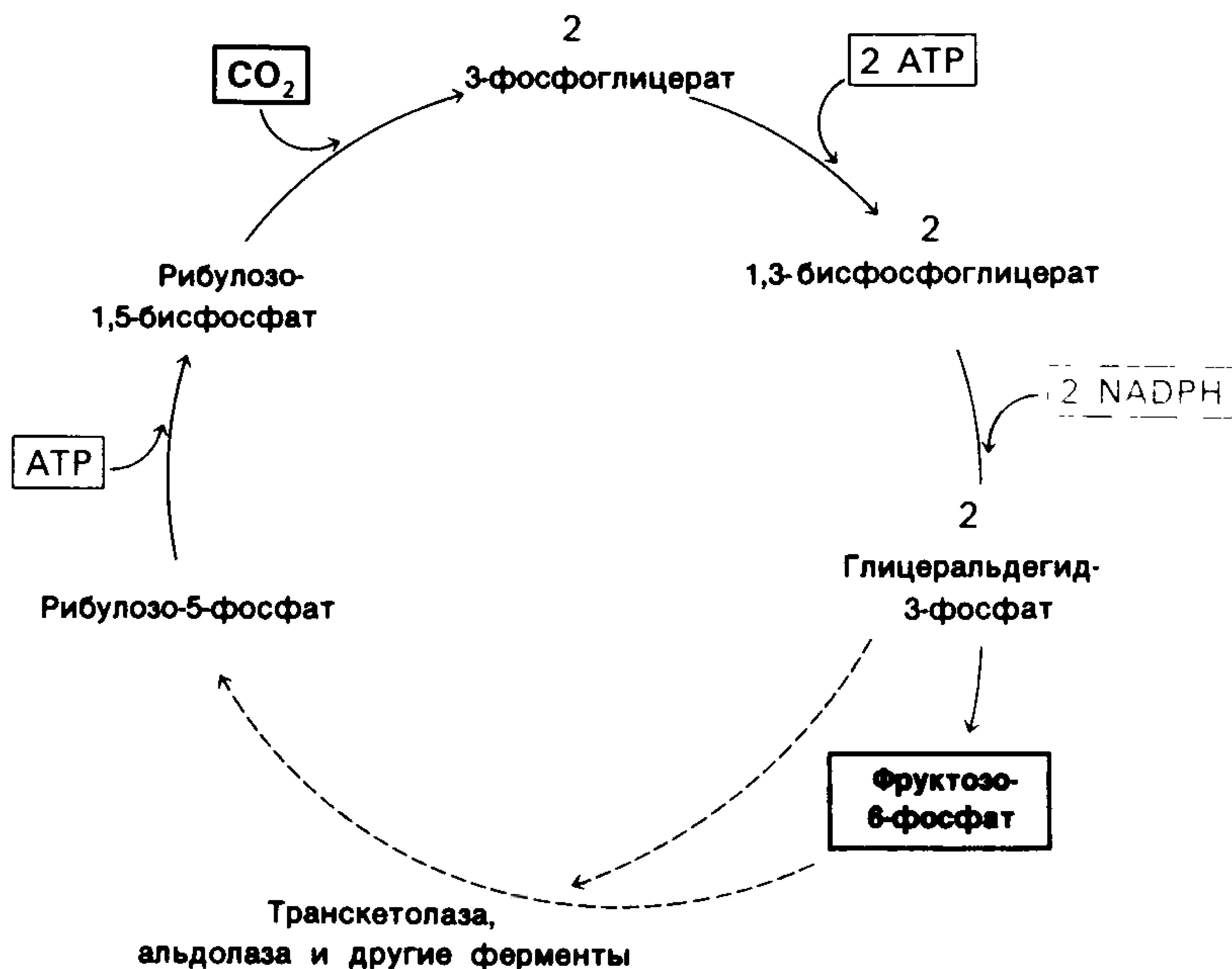
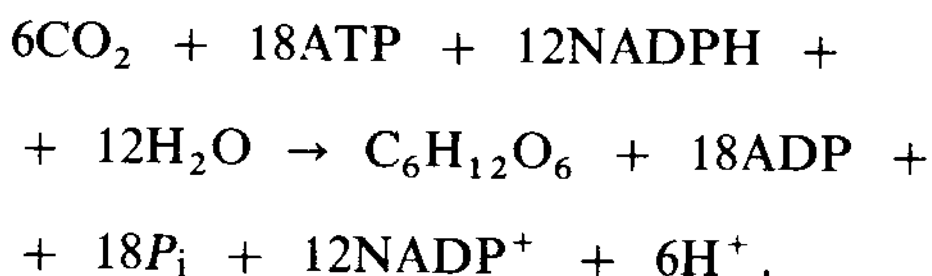


Рис. 19.22. Цикл Кальвина. Детальный путь образования рибулозо-5-фосфата из трехуглеродных и шестиуглеродных сахаров на этой схеме не показан.

19.17. Три ATP и два NADPH доводят CO_2 до уровня гексозы

Каков расход энергии для синтеза гексозы? Требуется шесть оборотов цикла Кальвина, поскольку в каждом из них восстанавливается один атом углерода (рис. 19.22). 12 ATP расходуются на фосфорилирование 12 молекул 3-фосфоглицерата в 1,3-бисфосфоглицерат и 12 NADPH потребляются при восстановлении 12 молекул 1,3-бисфосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат. Еще шесть ATP расходуется на регенерирование рибулозо-1,5-бисфосфата.

Теперь напишем уравнение равновесия для суммарной реакции цикла Кальвина:



$$6CO_2 + 18ATP + 12NADPH + 12H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 18ADP + 18P_i + 12NADP^+ + 6H^+.$$

Таким образом, при превращении CO_2 в гексозу (глюкозу или фруктозу) потребляются три молекулы ATP и две молекулы NADPH. Эффективность фотосинтеза может быть измерена следующим образом:

1. $\Delta G^{0'}$ для восстановления CO_2 до уровня гексозы составляет 114 ккал/моль.

2. При восстановлении $NADP^+$ происходит перенос двух электронов. Следовательно, образование двух NADPH требует засасывания фотосистемой I четырех фотонов. Электроны, отдаваемые фотосистемой I, восполняются фотосистемой II, которая должна поглотить эквивалентное количество протонов. Значит, для генерирования требуемого NADPH необходимы восемь фотонов. Одновременно образуются три молекулы ATP, которые нужны для превращения CO_2 в гексозу.

3. Содержание энергии в моле фотонов с длиной волны 600 нм равно 47,6 ккал, и, следовательно, приток энергии от восьми молей фотонов составит 381 ккал. Таким образом, общая эффективность фотосинтеза при стандартных условиях составляет минимум 114/381, или 30%.

19.18. Регуляция цикла Кальвина

Существует ряд регуляторных механизмов, обеспечивающих функционирование цикла Кальвина лишь при условии образования ATP и NADPH в ходе световых реакций фотосинтеза. Стадией, лимитирующей скорость, в цикле Кальвина является карбоксилирование рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата. *Активность рибулозо-1,5-бисфосфат—карбоксилазы значительно увеличивается при*

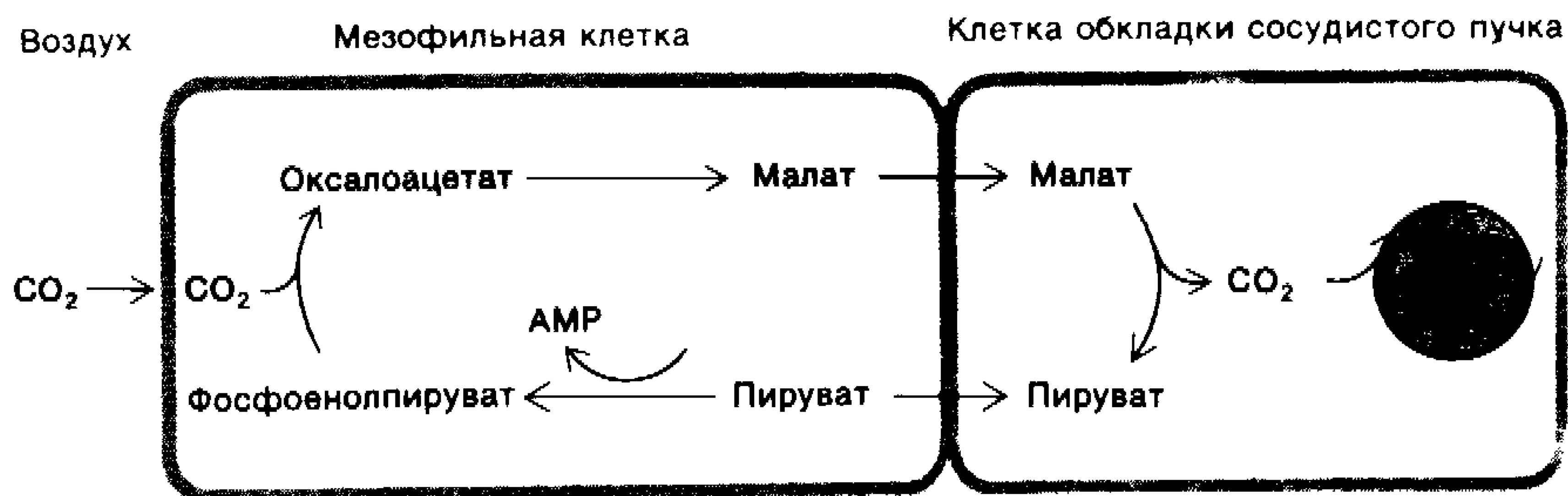


Рис. 19.23. Схематическое изображение основных этапов C_4-пути.

освещении; это увеличение осуществляется тремя путями:

1. NADPH, образуемый фотосистемой I, служит аллостерическим активатором карбоксилазы.

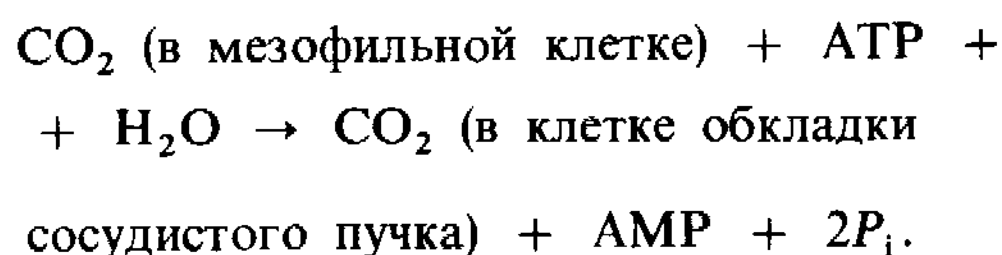
2. Скорость ферментативной реакции значительно возрастает при повышении pH с 7 до 9. Индуцируемое светом закисление полости тилакоида приводит к защелачиванию стромы, которое активирует карбоксилазу.

3. Карбоксилаза активируется Mg^{2+}. Напомним, что Mg^{2+} высвобождается в строму при засасывании протонов в полость тилакоидов под действием освещения (разд. 19.13).

19.19. У тропических растений функционирует C_4-путь, ускоряющий фотосинтез путем концентрирования CO_2

У тропических растений, таких, как сахарный тростник, имеется дополнительный путь транспорта CO_2 к месту локализации цикла Кальвина в фотосинтезирующих клетках. Источником первых сведений о существовании этого пути явились исследования, показавшие, что радиоактивность импульсной метки $^{14}CO_2$ первоначально появляется в четырехуглеродных соединениях малате и аспартате, а не в 3-фосфоглицерате. Смысл данного пути, раскрытого Хэчем и Слэком (M. D. Hatch а C. R. Slack), состоит в том, что C_4-соединения переносят CO_2 *от мезофильных клеток, соприкасающихся с воздухом, к клеткам обкладки сосудистого пучка, которые служат основным местом локализации фотосинтеза* (рис. 19.23). Декарбоксилирование C_4-соединения в клетках обкладки сосудистого пучка поддерживает высокую концентрацию CO_2 в месте локализации цикла Кальвина. Образовавшееся трехуглеродное соединение возвращается в мезофильную клетку для следующего цикла карбоксилирования.

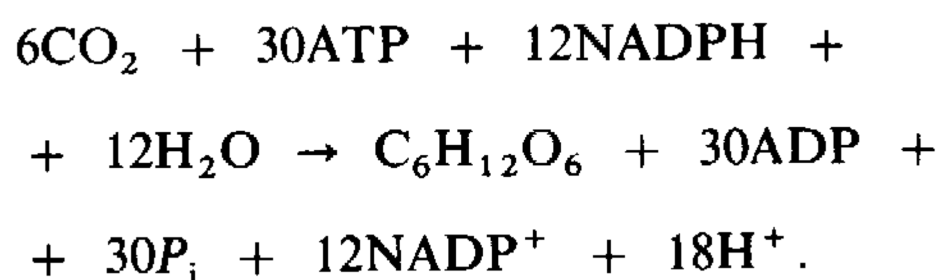
Этот C_4-путь (рис. 19.23) для транспорта CO_2 начинается в мезофильной клетке с конденсации CO_2 и фосфоенолпирувата, приводящей к образованию *оксалоацетата*, реакции, катализируемой фосфоенолпируват-карбоксилазой. У некоторых видов оксалоацетат превращается в *малат* под действием $NADP^+$-зависимой малатдегидрогеназы. Малат поступает в клетки обкладки сосудистого пучка и декарбоксилируется в хлоропластах $NADP^+$-зависимой малатдегидрогеназой. Высвободившийся CO_2 включается в цикл Кальвина обычным путем, конденсируясь с рибулозо-1,5-бисфосфатом. Образовавшийся при декарбоксилировании пируват возвращается в мезофильную клетку. Наконец, происходит регенерирование фосфоенолпирувата, в ходе реакции пирувата с ATP и P_i. Эта единственная реакция, катализируемая пируват-P_i-дикиназой, запускается последующим гидролизом PP_i. Суммарная реакция описанного C_4-пути выглядит следующим образом:



$$CO_2 \text{ (в мезофильной клетке)} + ATP + H_2O \rightarrow CO_2 \text{ (в клетке обкладки сосудистого пучка)} + AMP + 2P_i.$$

Таким образом, *при транспорте CO_2 в хлоропласты клеток обкладки сосудистого пучка потребляются две высокоэнергетические фосфатные связи.*

В случае одновременного функционирования C_4-пути и цикла Кальвина суммарная реакция приобретает следующий вид:



$$6CO_2 + 30ATP + 12NADPH + 12H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 30ADP + 30P_i + 12NADP^+ + 18H^+.$$

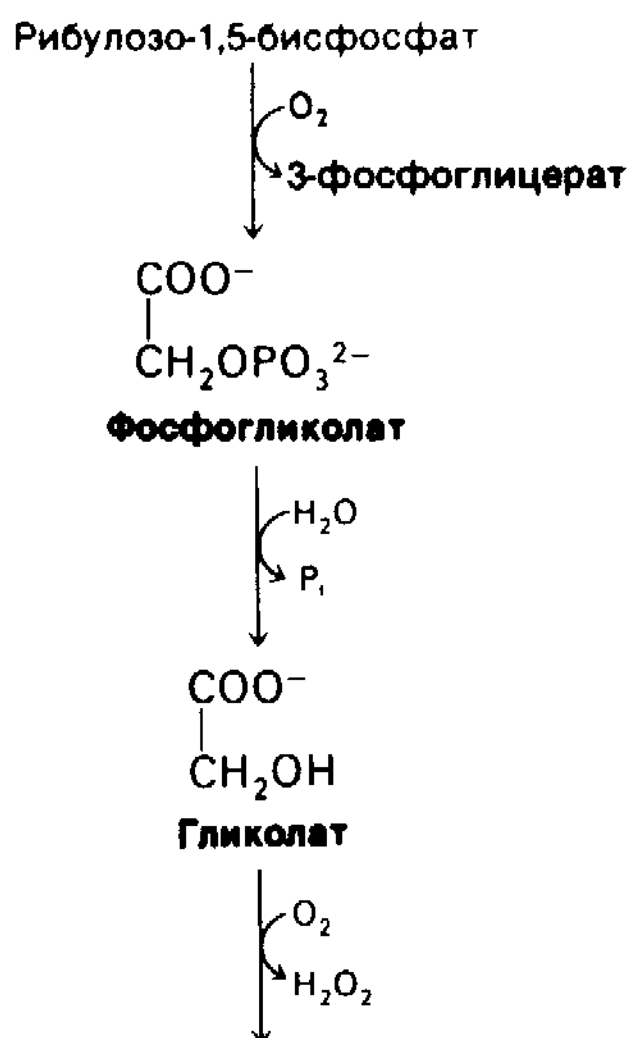


Рис. 19.24. Образование и распад гликолата.

Отметим, что при поступлении CO_2 в цикл Кальвина по C_4-пути на одну молекулу образующейся гексозы потребляется 30 ATP, а при отсутствии C_4-пути – 18 ATP. Высокая концентрация CO_2 в клетках обкладки сосудистого пучка растений, у которых функционирует C_4-путь, обусловленная расходом дополнительных 12 ATP, является критической для высокой скорости фотосинтеза в этих растениях, поскольку в условиях избытка света CO_2 служит лимитирующим фактором. Высокая концентрация CO_2 также сводит к минимуму потерю энергии, вызываемую фотодыханием, процессом, который описывается в следующей главе.

19.20. Гликолат – основной субстрат при фотодыхании

Освещаемые растения поглощают O_2 и выделяют CO_2 в ходе процесса, называемого *фотодыханием*, которое отличается от митохондриального дыхания. Биологическая роль этого процесса представляет собою загадку. *Гликолат*, основной субстрат фотодыхания, происходит из *фосфогликолата*, образующегося при оксигенировании рибулозо-1,5-бисфосфата (рис. 19.24). Реакция катализируется рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазой, которая является одновременно и *оксигеназой*, и карбоксилазой. На самом деле, оксигенирование и карбоксилирование представляют собою конкурирующие реакции, использующие один и тот же активный центр. Образующийся при этом фосфогликолат гидролизуется под действием специфической фосфатазы до гликолата. Последующий обмен гликолата протекает в *пероксисомах* (называемых также *микротельцами*) (рис. 19.25). Гликолат окисляется гликолатоксидазой в *глиоксилат*. H_2O_2, образующийся при этой реакции, расщепляется каталазой на H_2O и O_2. Далее глиоксилат подвергается трансаминированию, давая *глицин*. В митохондриях может происходить образование серина из двух молекул глицина.

Фотодыхание представляется непроизводительным процессом, при котором органический углерод превращается в CO_2 без образования ATP и NADH или другой видимой «прибыли». Растения, у которых отсутствует C_4-путь, теряют при фотодыхании от 25 до 50% фиксированного ими углерода. В противоположность им у *тропических растений, обладающих C_4-путем, уровень фотодыхания низок, потому что оксигени-*



Рис. 19.25. Электронная микрофотография пероксисомы растительной клетки. (Печатается с любезного разрешения д-ра Sue Ellen Frederick.)

рование рибулозо-1,5-бисфосфата конкурентно подавляется высокой концентрацией CO_2 в клетках обкладки сосудистого пучка. Оксигеназная активность рибулозо-1,5-бисфосфат—карбоксилазы при повышении температуры возрастает быстрее, чем ее карбоксилазная активность. Следовательно, C_4-путь играет особенно важную роль в снижении активности фотодыхания до минимума при высоких температурах. Географическое распределение C_4-растений (обладающих C_4-путем) и C_3-растений (у которых этот путь отсутствует) можно теперь понять на молекулярном уровне. C_4-растения имеют преимущества в условиях высокой температуры окружающей среды и интенсивного освещения, и поэтому они преобладают в тропиках. C_3-растения, у которых на молекулу образующейся гексозы потребляется в отсутствие фотодыхания 18 ATP (по сравнению с 30 ATP у C_4-растений), более эффективно функционируют при температурах ниже 28°C, и они преобладают в условиях умеренного климата.

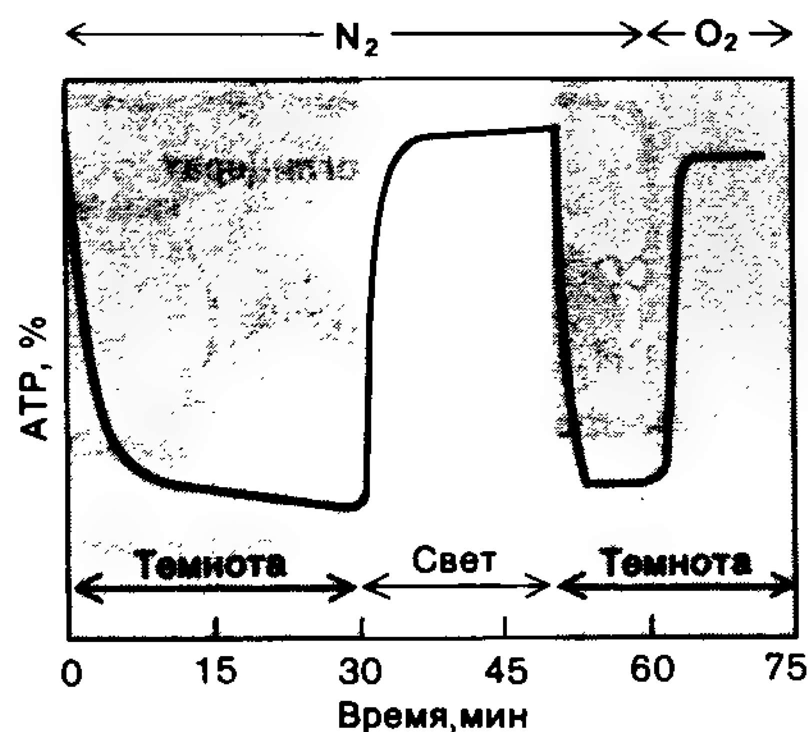


Рис. 19.26. Эксперимент, показывающий, что при освещении галобактерии могут синтезировать ATP в отсутствие O_2. (Stockenius W., The purple membrane of Saltloving bacteria, 1976. Scientific American Inc.)

19.21. Белок пурпурных мембран галобактерий перекачивает протоны для синтеза ATP

Источником сведений о механизме фотофосфорилирования и окислительного фосфорилирования явились исследования фотосинтетических процессов у галобактерий, у которых имеется светопоглощающая группа, отличная от хлорофилла. Для роста этих бактерий требуются высокие концентрации NaCl, оптимальной является концентрация 4,3 M (обычная морская вода содержит 0,6 M NaCl). Галобактерии обнаруживаются в природных соленых озерах и в водоемах, из которых выпаривают морскую воду для получения соли, как, например, в заливе Сан-Франциско вблизи аэропорта. У этих бактерий имеется клеточная оболочка, состоящая из мембраны, окруженной гликопротеиновой клеточной стенкой. Вальтер Стекениус (Walther Stoeckenius) разделил эту клеточную мембрану на желтую, красную и пурпурную фракции. Желтая фракция состояла главным образом из стенок газовых вакуолей, благодаря которым бактерии достигают нужной им глубины в воде. Красная фракция содержит дыхательную цепь и другие ферментные механизмы для окислительного фосфорилирования, а также защитный красный пигмент, предохраняющий бактерии от летального действия синего света. Пурпурная фракция состоит из *белка пурпурных мембран* (26 кДа) и сорока связанных с ним липидов. Этот белок называют также *бактериородопсином*, потому что он, подобно родопсину, зрительному пигменту сетчатки позвоночных (разд. 37.13), содержит в качестве хромофора *ретиналь*. Ретиналевая группа присоединена к лизиновой боковой цепи белка протонированной связью шиффова основания.

В присутствии O_2 галобактерии синтезируют ATP в ходе окислительного фосфорилирования. При недостатке кислорода они переключаются на фотосинтетический механизм (рис. 19.26). Стекениус и его сотрудники показали, что *роль белка пурпурных мембран состоит в перекачке протонов при освещении изнутри клетки наружу.* Действительно, белок пурпурных мембран пронизывает насквозь клеточную мембрану (рис. 10.32 в разд. 10.18), чего и следует ожидать для протонного насоса. Пламенно-спектроскопические исследования показали, что свет переводит ретиналевую связь шиффова основания из протонированной формы с полосой поглощения при 560 нм в депротонированную с пиком при 412 нм. Этот цикл реакций занимает немногие миллисекунды, и при ярком освещении каждая молекула белка пурпурных мембран может

перекачивать несколько сотен H^+ в секунду. Генерируемая таким образом протонодвижущая сила используется далее ATP-синтезирующим ансамблем (F_0 F_1) для фосфорилирования ADP в пространственно обособленной области красной мембраны. Комплекс $F_0 - F_1$ ориентирован таким образом, что его глобулярный F_1-компонент обращен внутрь клетки. Тот же самый ATP-синтезирующий ансамбль используется при окислительном фосфорилировании и фотофосфорилировании. Протонодвижущая сила, генерируемая каждым процессом, может также запускать активный транспорт ионов и аминокислот в галобактерии.

Наличие очищенной фракции пурпурных мембран позволило Стекениусу и Эфроиму Рэкеру осуществить высокоинформативный эксперимент по реконструкции. Они получили синтетические фосфолипидные пузырьки, содержащие белок пурпурных мембран из галобактерий и ATP-синтезирующий комплекс $F_1 - F_0$ из митохондрий сердца крупного рогатого скота (рис. 19.27). Освещение этих пузырьков приводило к возникновению протонного градиента через мембрану и к генерированию ATP из ADP и P_i. Синтез ATP прекращался при добавлении переносчиков протонов, нарушавших протонный градиент, что говорит о важной роли протонодвижущей силы для этого процесса. *Описанные реконструированные пузырьки, содержащие только протонный насос и ATP-синтетазу в замкнутой мембране, непроницаемой для протонов, представляют собою простейшую модельную систему для хемиосмотического преобразования энергии.*

Заключение

Первым этапом фотосинтеза является поглощение света молекулами хлорофилла, организованными в фотосинтезирующие единицы в мембранах тилакоидов хлоропластов. Возбужденная энергия переносится от одной молекулы хлорофилла к другой, пока не улавливается реакционным центром. Критическим событием, происходящим в реакционном центре, является активированный светом перенос одного электрона на акцептор против градиента химического потенциала. Фотосинтез у зеленых растений требует взаимодействия двух световых реакций. Фотосистема I генерирует сильный восстановитель (связанный ферредоксин), приводящий к образованию NADPH. Фотосистема II генерирует сильный окислитель, который образует O_2 из H_2O.

Поток электронов через электрон-транспортную цепь от фотосистемы II к фотосистеме I приводит к возникновению протонного градиента, который в свою очередь приводит к синтезу ATP. Таким образом, свет вызывает передвижение электронов от H_2O к NADPH с одновременным генерированием ATP. Кроме того, протонный градиент и соответственно ATP могут быть генерированы без образования NADPH в результате процесса, называемого циклическим фотофосфорилированием, вслед за поглощением света фотосистемой I. Фотофосфорилирование, подобно окислительному фосфорилированию, запускается протонодвижущей силой, и, следовательно, для его осуществления требуется замкнутое пространство (компартмент.)

ATP и NADPH, образующиеся при световых реакциях фотосинтеза, используются для превращения CO_2 в гексозы и другие органические соединения. Темновая фаза фотосинтеза, называемая циклом Кальвина, начинается с реакции между CO_2 и рибулозо-1,5-бисфосфатом, приводящей к образованию двух молекул *3-фосфоглицерата*. Стадии превращения 3-фосфогли-

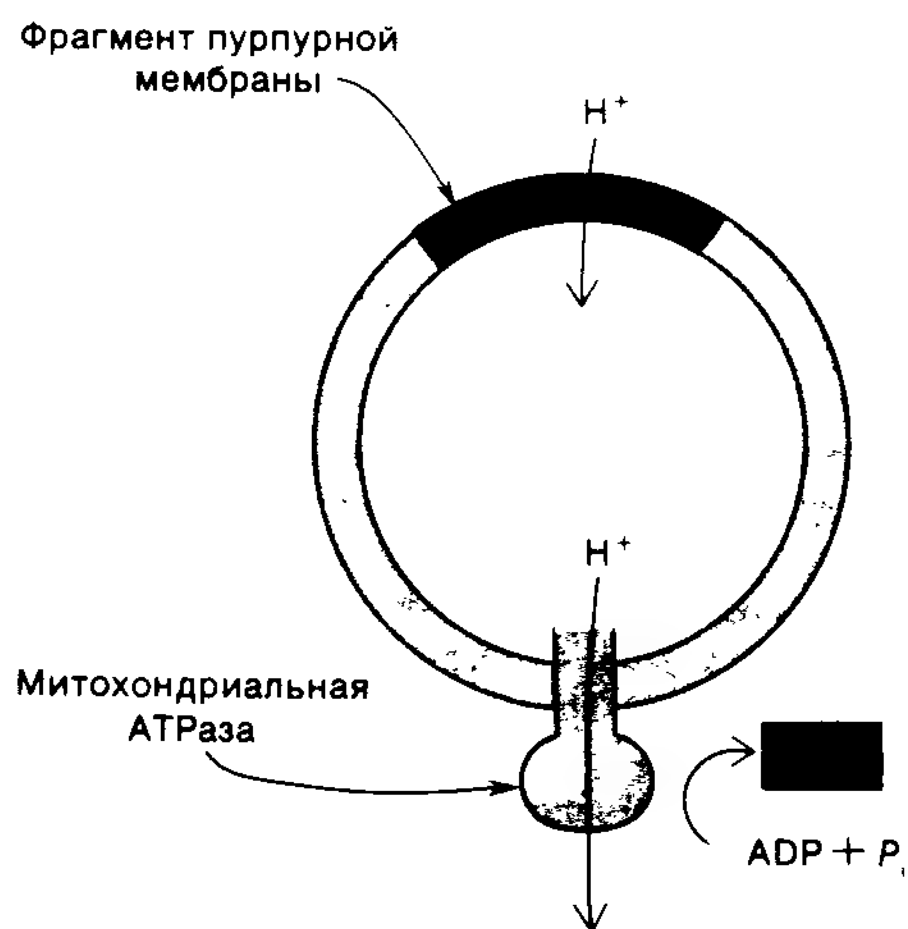


Рис. 19.27. Реконструированные мембранные пузырьки, содержащие белок пурпурных мембран и ATP-синтезирующий комплекс митохондрий, образуют ATP при освещении.

церата во фруктозо-3-фосфат и глюкозо-6-фосфат аналогичны таковым при глюконеогенезе с той лишь разницей, что глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназа хлоропластов специфична в отношении NADPH, а не NADH. В результате сложной последовательности реакций происходит регенерирование рибулозобисфосфата из фруктозо-6-фосфата, глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата. Некоторые стадии генерирования рибулозо-1,5-бисфосфата подобны таковым пентозофосфатного пути. При превращении CO_2 в гексозу потребляются три ATP и два NADPH. Для генерирования двух NADPH четыре протона поглощаются фотосистемой I и еще четыре – фотосистемой II.

У тропических растений имеется дополнительный путь концентрирования CO_2 в месте локализации цикла Кальвина. Этот C_4-путь обеспечивает тропическим растениям преимущество при высокой интенсивности освещения и сводит к минимуму конкурирующую реакцию, оксигенирование рибулозо-1,5-бисфосфата.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Hinkle P.C., McCarty R.E., 1978. How cells make ATP, Sci. Amer., **238(3)**, 104–123. (Содержит интересную дискуссию по фотофосфорилированию.)

Stoeckenius W., 1976. The purple membrane of saltloving bacteria, Sci. Amer., **234(6)**, 38–46. (Дано раскрытие фотосинтетического механизма, основанного предпочтительно на ретинале, а не на хлорофилле.)

Miller K.R., 1979. The photosynthetic membrane, Sci. Amer., **24(4)**, 102–113.

Bassham J.A., 1962. The ,path of carbon in photosynthesis, Sci. Amer., **206(6)**, 88–100.

Обзоры

Arnon D.I., 1977. Photosynthesis 1950–1975: changing concepts and perspectives. In: Trebst A. and Avron M. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 5, New Series, pp. 7–56, Springer-Verlag. (Особое внимание обращено на фотофосфорилирование и роль ферредоксина.)

Halliwell B., 1978. The chloroplast at work: a review of modern developments in our understanding of chloroplast metabolism, Prog. Biophys. Mol. Biol., **33**, 1–54. (Особое внимание уделяется темновым реакциям в хлоропластах.)

Книги

Bonner J., Varner J.E. (eds.), 1976. Plant Biochemistry (3rd ed.), Academic Press. [Содержит статьи Парка (R.B. Park) о хлоропластах, Хэча (M.D. Hatch) о путях углерода при фотосинтезе и Кока (B. Кок) о превращениях энергии при фотосинтезе.]

Gregory R.P.F., 1977. Biochemistry of Photosynthesis (2nd ed.), Wiley.

Govindjee (ed.), 1975. Bioenergetics of Photosynthesis, Academic Press.

Olson J.M., Hind G. (eds.), Chlorophyll-Proteins, Reaction Centers and Photosynthetic Membranes, Brookhaven Symposium in Biology, vol. 28.

Первичные события при фотосинтезе

Jagendorf A.T., 1967. Acid-base transition and phosphorylation by chloroplasts, Fed. Proc., **26**, 1361–1369.

Blankenship R.E., Parson W.W., 1978. The photochemical electron transfer reactions of photosynthetic bacteria and plants, Ann. Rev. Biochem., **47**, 635–653.

Avron M., 1977. Energy transduction in chloroplasts, Ann. Rev. Biochem., **46**, 143–155.

Radmer R., Kok B., 1975. Energy capture in photosynthesis: photosystem II, Ann. Rev. Biochem., **44**, 409–433.

Junge W., 1977. Membrane potentials in photosynthesis, Ann. Rev. Plant Physiol., **28**, 503–536.

Stoeckenius W., Lozier R.H., Bogomolni R.A, 1979. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria, Biochem. Biophys. Acta, **505**, 215–278.

Фиксация углерода при фотосинтезе

Zelitch I., 1975. Pathways of carbon fexation in green plants, Ann. Rev. Biochem., **44**, 123–145.

Kelly G.J., Latzko E., Gibbs M., 1976. Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism, Ann. Rev. Plant Physiol., **27**, 181–205.

Jensen R.G., Bahr J.T., 1977. Ribulose 1,5-biphospahte – carboxylase-oxygenase, Ann. Rev. Plant Physiol., **28**, 379–400.

Структура фотосинтетических белков

Fenna R.E., Matthews B.W., 1975. Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*, Nature, **258**, 573–577.

Colman P.M., Freeman H.C., Guss J.M., Murata M., Norris V.A., Ramshaw J.A.A., Venkatappa M.P., 1978. X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2,7 Å resolution, Nature, **272**, 319–324.

Baker T.S., Eisenberg D., Eiserling F., 1977. Ribulose biphosphate carboxylase: a two-layered, square-shaped molecule of symmetry 422, Sciece, **196**, 293–295.

Вопросы и задачи

1. Вычислите $\Delta E_0'$ и $\Delta G^{0'}$ для восстановления $NADP^+$ под действием растворимого ферредоксина.

2. Седогептулозо-1,7-бисфосфат – промежуточный продукт цикла Кальвина, но не пентозофосфатного пути. Какова ферментативная основа этого различия?

3. Предположим, что в освещаемой суспензии *Chlorella* активно идет фотосинтез, когда свет внезапно выключается. Как изменится в следующую минуту содержание 3-фосфоглицерата и рибулозо-1,5-бифосфата?

4. Предположим, что в освещаемой суспензии *Clorella* активно протекал фотосинтез в присутствии 1% CO_2, когда концентрация CO_2 внезапно снизилась до 0,003%. Какое действие должно было оказать это снижение на содержание 3-фосфоглицерата и рибулозо-1,5-бисфосфата в следующую минуту?

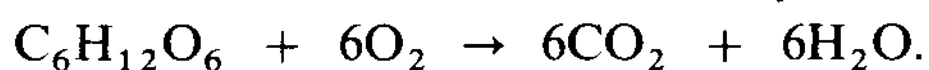
5. Фотосинтезирующий аппарат сине-зеленой водоросли содержит помимо хлорофилла *a* большие количества фикоэритрина и фикоцианина. Максимум поглощения фикоэритрина находится в области между 480 и 600 нм, фикоцианина – около 620 нм. Выскажите предположение о роли этих дополнительных пигментов фотосинтеза.

6. Уравнение ван Нила для фотосинтеза у высших растений следующее:

$$6CO_2 + 12H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2.$$

а) H_2O присутствует в обоих частях этого уравнения. Имеет ли это чисто формальное значение или является выражением важного аспекта фотосинтетического механизма?

о) Для описания дыхания принято следующее уравнение:



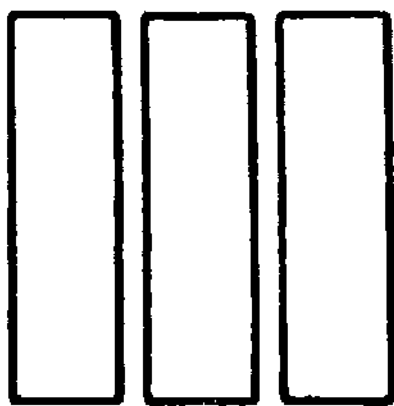
$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O.$$

Раскрывает ли уравнение ван Нила (обращенное) более полно механизм дыхания? Иными словами, требует ли сгорание глюкозы использования шести молекул H_2O?

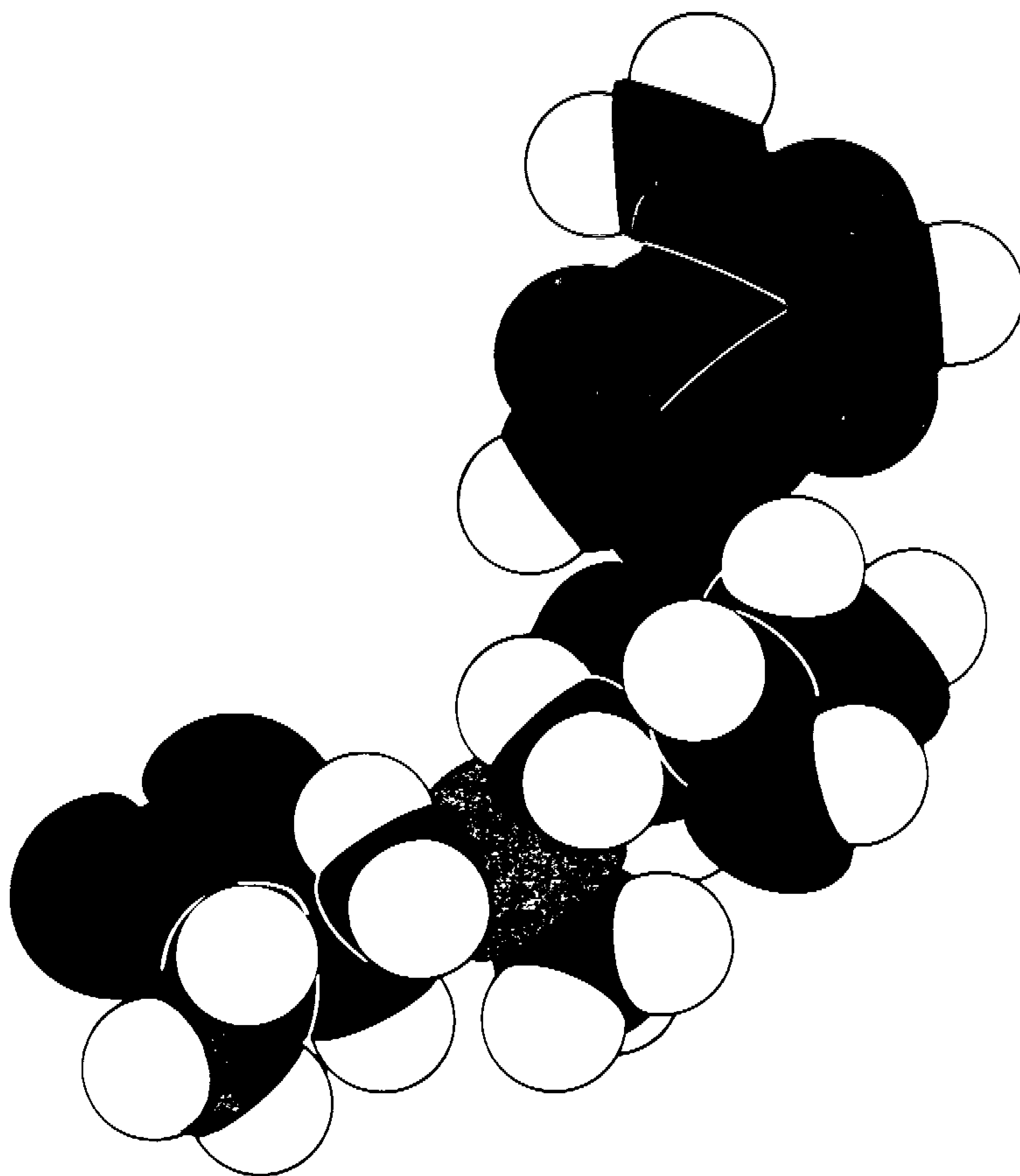
7. Хлоропласты, освещаемые в отсутствие ADP и P_i, образуют ATP во время последующего темнового периода при добавлении ADP и P_i. Количество ATP, синтезируемого в темноте, значительно увеличивается, если перед освещением добавляют пиридин. Почему?

8. Дихлорфенилдиметилмочевина (DCMU), гербицид, нарушает фотофосфорилирование и выделение O_2 в отсутствие искусственного акцептора электронов. Однако она не блокирует реакцию Хилла. Предложите место ингибиторного действия этого гербицида.

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benlow R. J., Hood L. E., Biochemistry: A Problems Approach (Benjamin, 1974), гл. 12.

Часть 

Биосинтез предшественников макромолекул



Модель S-аденозилметионина, донора метильных групп во многих процессах биосинтеза.

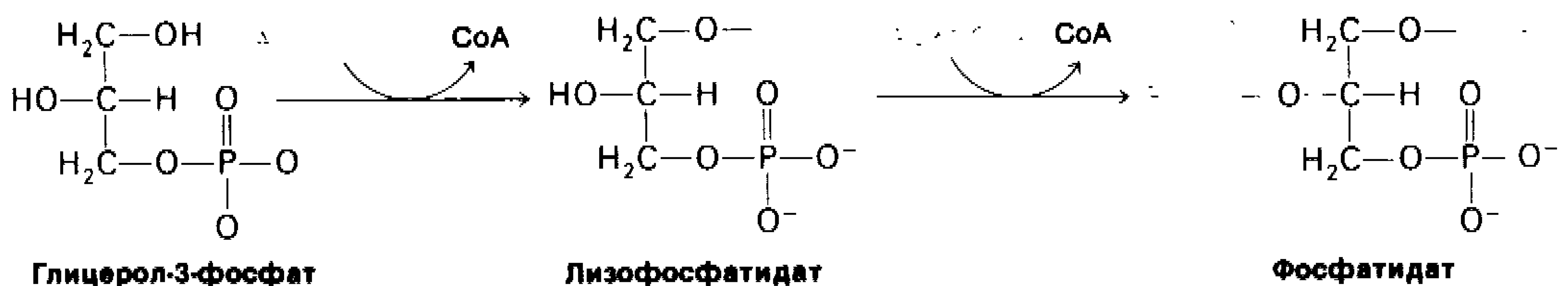
ГЛАВА 20

Биосинтез мембранных липидов и стероидных гормонов

Теперь мы перейдем от вопроса о генерировании энергии в ходе метаболических превращений к биосинтезу предшественников макромолекул и других близких к ним молекул. В настоящей главе рассматривается биосинтез фосфоацилглицеролов (фосфоглицеридов), сфинголипидов и холестерола – трех важных компонентов биологических мембран (гл. 10). Здесь также описан синтез триацилглицеролов (триглицеридов), так как соответствующие реакции частично совпадают с синтезом фосфоацилглицеролов; наконец, описан синтез стероидных гормонов, поскольку они образуются из холестерола. Биосинтез холестерола – пример сложной системы реакций, в ходе которых происходит сборка больших углеродных скелетов из пятиуглеродных молекул.

20.1. Фосфатидная кислота – промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов и триацилглицеролов

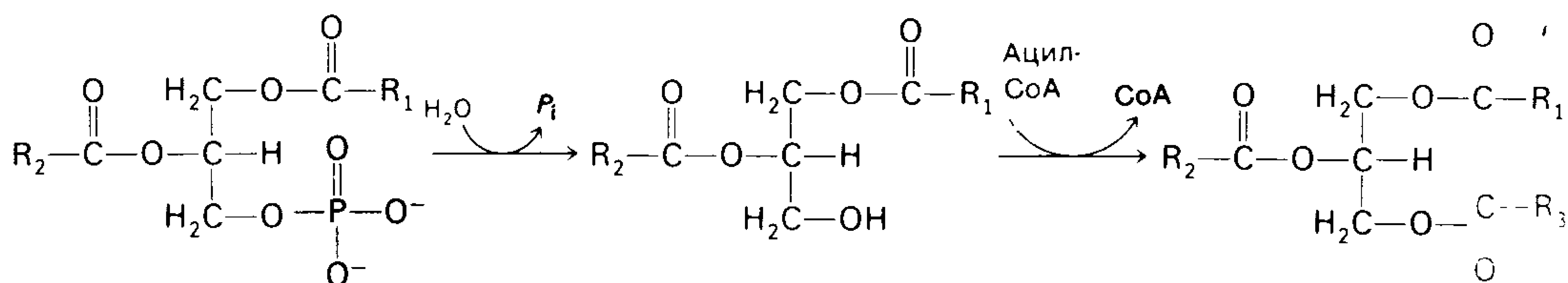
Фосфатидат (1,2-диацилглицерол-3-фосфат) – общий промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов и триацилглицеролов. Синтез начинается с *глицерол-3-фосфата*, образующегося главным образом при восстановлении дигидроксиацетонфосфата и в меньшей степени путем фосфорилирования глицерола. Глицерол-3-фосфат ацилируется с помощью ацил-СоА и образует *лизофосфатидат, который снова ацилируется при участии ацил-СоА с образованием фосфатидата.* Эти реакции ацилирования катализируются глицерофосфат-ацилтрансферазой.

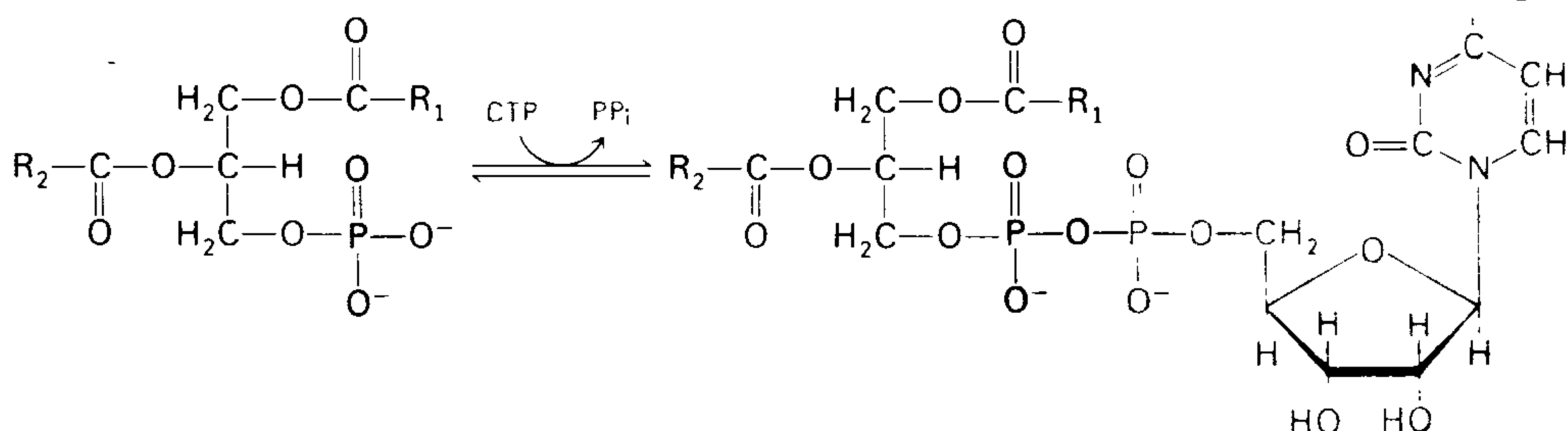


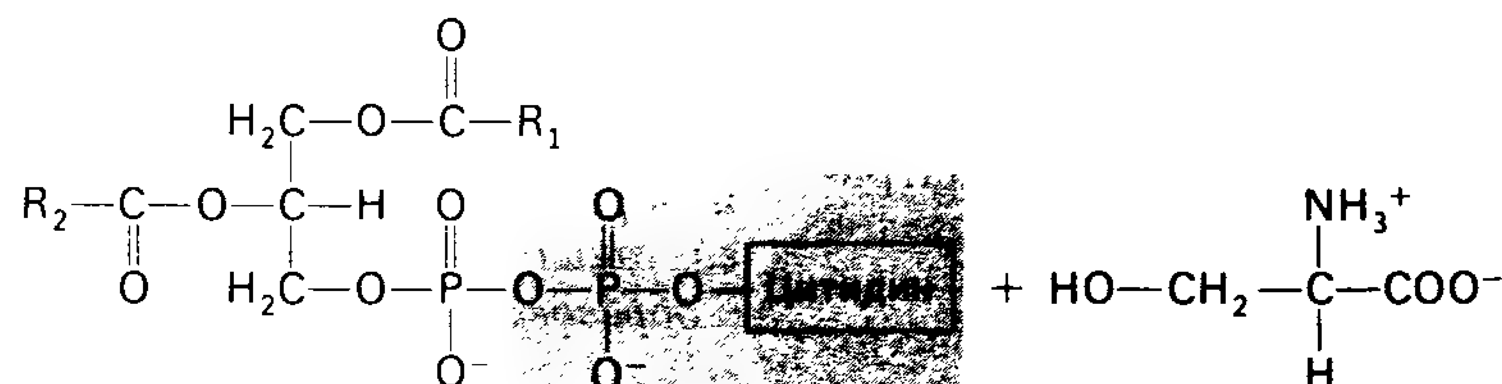
После реакции образования фосфатидата метаболические пути раздваиваются. При синтезе триацилглицеролов фосфатидат гидролизуется специфической фосфатазой с образованием *диацилглицерола* (*диглицерида*). Этот промежуточный продукт ацилируется, образуя *триацилглицерол* в результате реакции, катализируемой диацилглицерол—ацилтрансферазой. Эти фер-

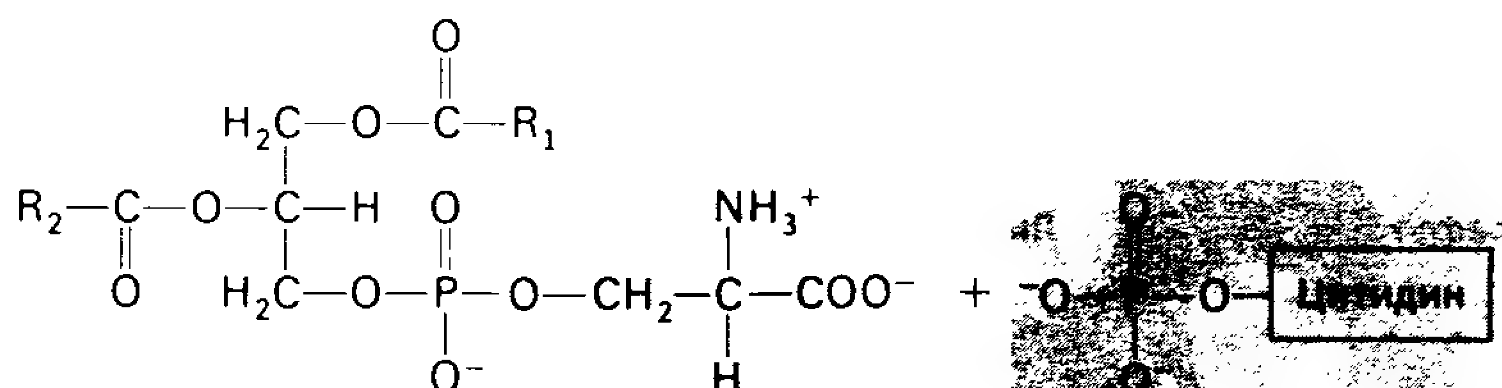
Анаболизм – совокупность процессов биосинтеза.

Катаболизм – совокупность процессов деградации. Происходят от греческих слов ana – вверх; kata – вниз; ballein бросать.







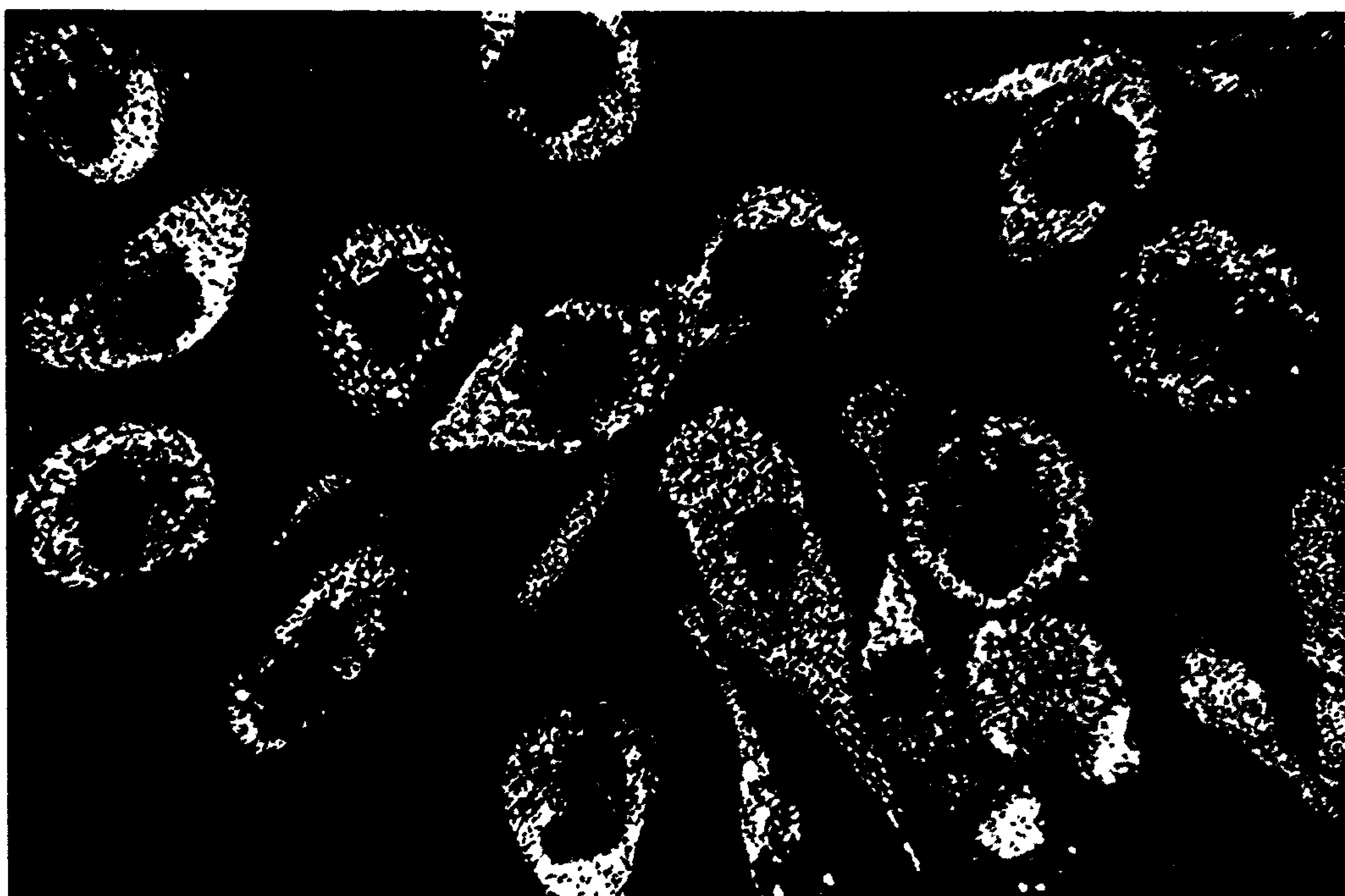


менты ассоциированы в связанном с мембраной комплексе *триацилглицерол-синтетазы.*

20.2. CDP-диацилглицерол–активированный промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов de novo

Существует несколько путей синтеза фосфолипидов. Синтез de novo начинается с образования *цитидиндифосфодиацилглицерола* (CDP-диацилглицерола) из фосфатидата и цитидинтрифосфата (CTP). Равновесие этой реакции смещается в сторону образования продукта благодаря гидролизу пирофосфата. Затем активированный фосфатидиловый остаток реагирует с гидроксильной группой полярного спирта. Если в качестве полярного спирта используется серин, то образуются *фосфатидилсерин* и цитидинмонофосфат (CMP).

Таким образом, цитидиновый нуклеотид играет в синтезе фосфоацилглицеролов ту же роль, что и уридиновый нуклеотид в образовании гликогена. В обоих случаях активированные промежуточные продукты (UDP-глюкоза или CDP-диацилглицерол) образуются из фосфорилированного субстрата (глюкозо-1-фосфата или фосфатидата) и нуклеозидтрифосфата (UTP или CTP). Затем активированный промежуточный продукт реагирует с гидроксильной группой (с OH-группой в 4-м положении на конце молекулы гликогена или



Фотография макрофагов, содержащих двоякопреломляющие кристаллы эфиров холестерола. Фотография сделана в поляризованном свете. (Печатается с любезного разрешения д-ра Richard Anderson.)

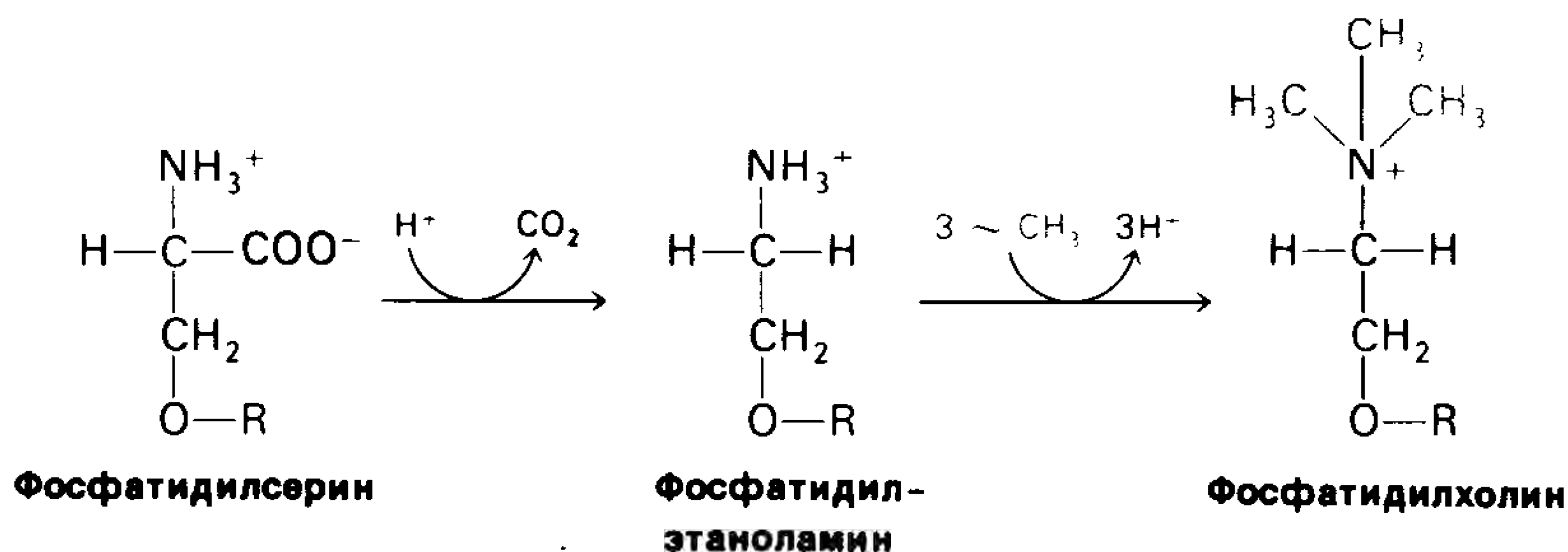
с гидроксильной группой боковой цепи серина).

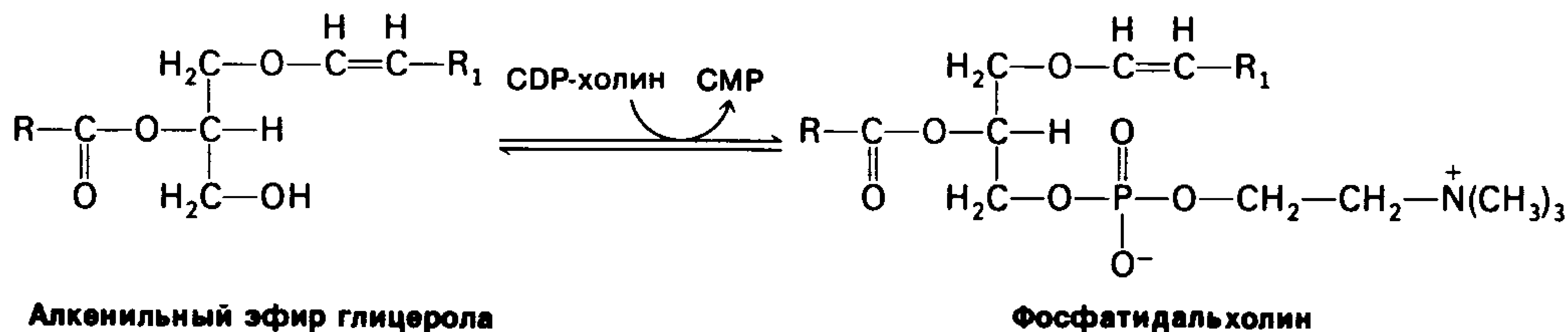
20.3. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин могут образовываться из фосфатидилсерина

Декарбоксилирование фосфатидилсерина под действием ферментов, содержащих в качестве простетической группы пиридоксальфосфат, дает *фосфатидилэтаноламин.* Затем аминогруппа этого фосфоацилглицерола трижды метилируется; при этом образуется фосфатидилхолин. Роль S-аденозилметионина, донора метильных групп в этой и многих других реакций метилирования, будет обсуждаться ниже (разд. 21.7).

20.4. Фосфоацилглицеролы могут также синтезироваться из готовых остатков

При синтезе фосфатидилхолина может также использоваться готовый холин. Такие реакции называются *резервным путем,* или *путем синтеза из готовых остатков* (salvage pathway) (рис. 20.2). Холин фосфорилируется с помощью АТР с образованием *фосфорилхолина,* который затем реагирует с СТР и образует *CDP-холин.*





Остаток фосфорилхолина этой молекулы переносится на диацилглицерол, образуя *фосфатидилхолин*. Следует отметить, что при синтезе из готовых остатков в качестве активированной молекулы выступает цитидиновое производное холинфосфата, а не фосфатидата.

Фосфатидилэтаноламин может быть синтезирован из этаноламина в результате аналогичной последовательности реакции. *Плазмалогены* также образуются из готовых остатков. Они отличаются от фосфоацилглицеролов тем, что в положении С-1 глицерола присоединен эфирной связью остаток ненасыщенной по α,β-положению кислоты. Последняя реакция синтеза фосфатидальхолина (плазмалогена, соответствующего фосфатидилхолину) – перенос фосфорилхолина с CDP-холина на алкенильный эфир глицерола.

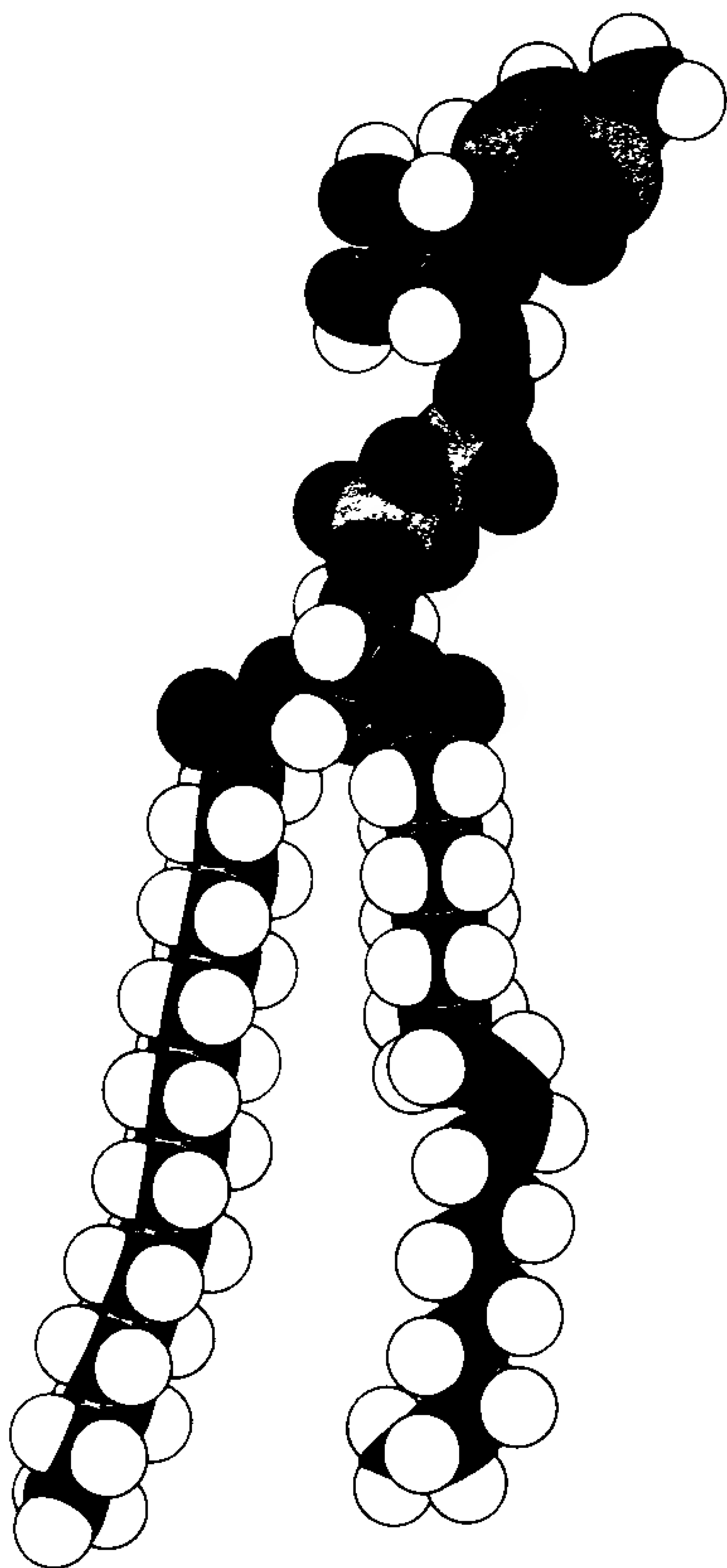


Рис. 20.1. Пространственная модель CDP-диацилглицерола.

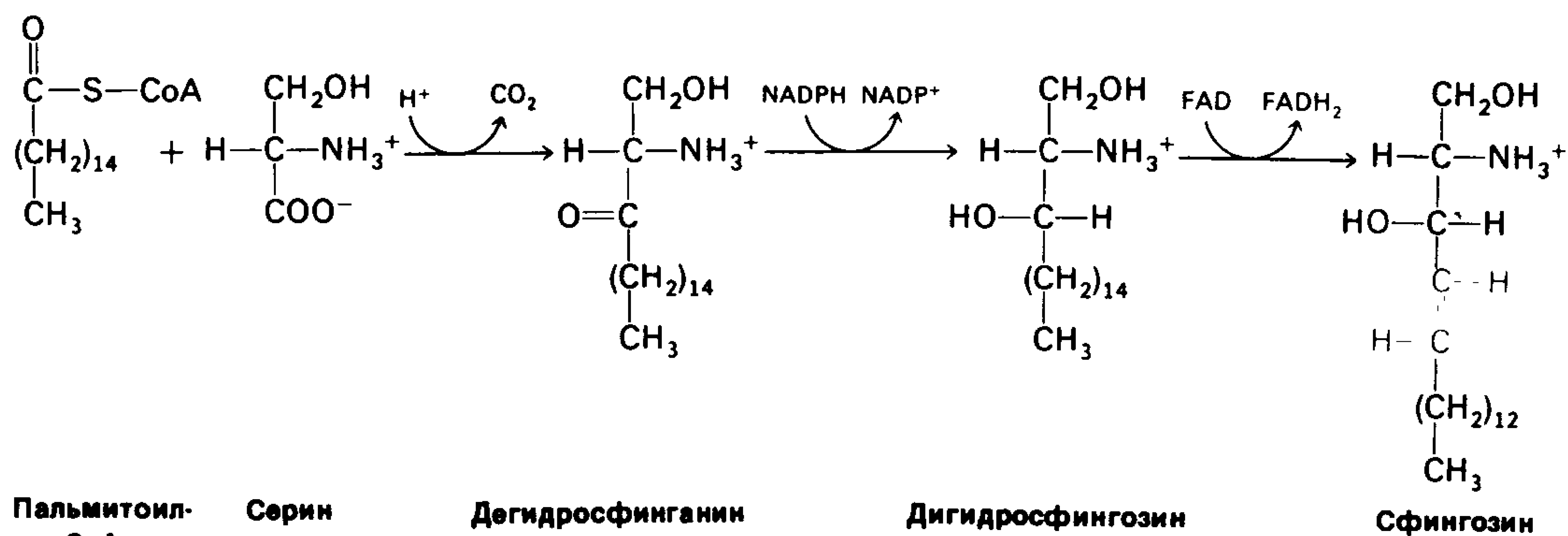
20.5. Выделено несколько специфических фосфолипаз

Ферменты можно использовать как высокоспецифические биохимические реагенты. Например, мы уже видели, что трипсин — незаменимый инструмент в изучении структуры белка. Специфические фосфолипазы могут сыграть столь же важную роль в изучении биологических мембран и их фосфолипидных компонентов. Фосфолипазы подразделяют на отдельные группы в соответствии с их специфичностью. На рис. 20.3 показано, какие связи гидролизуют фосфолипазы A_1, A_2, C и D.

20.6. Синтез церамида–основной структурной единицы сфинголипидов

Перейдем теперь от фосфолипидов к сфинголипидам. Их скелет образован не глицеролом, а *сфингозином*, алифатическим амином с длинной цепью. Пальмитоил-CoA и серин конденсируется с образованием дегидросфинганина, который затем превращается в сфингозин.

Аминогруппа сфингозина во всех сфинголипидах ацилирована (рис. 20.4). Ацил-CoA с длинной цепью реагирует со сфингозином, образуя *церамид* (N-ацилсфингозин). Концевая гидроксильная группа в сфинголипидах также замещена. В *сфингомиелине* заместителем является фосфорилхолин, происходящий из CDP-холина. В *цереброзиде* к концевой гидроксильной группе церамида присоединена глюкоза или галактоза. В качестве доноров остатков сахара для цереброзидов выступают UDP-глюкоза и UDP-галактоза. В *ганглио-*



зиде к церамиду присоединен через остаток глюкозы олигосахарид (см. рис. 20.5).

20.7. Ганглиозиды – богатые углеводами сфинголипиды, содержащие кислые сахара

Ганглиозиды относятся к наиболее сложным сфинголипидам. К церамиду присоединяется *олигосахаридная цепь*, содержащая хотя бы один кислый остаток сахара. Эти кислые сахара – N-ацетилнейраминат и N-гликолилнейраминат, называемые *сиаловыми кислотами*. Скелет этих молекул, состоящий из девяти атомов углерода, синтезируется из фосфоенолпирувата (C_3-элемент) и N-ацетилманнозамин-6-фосфата (C_6-элемент).

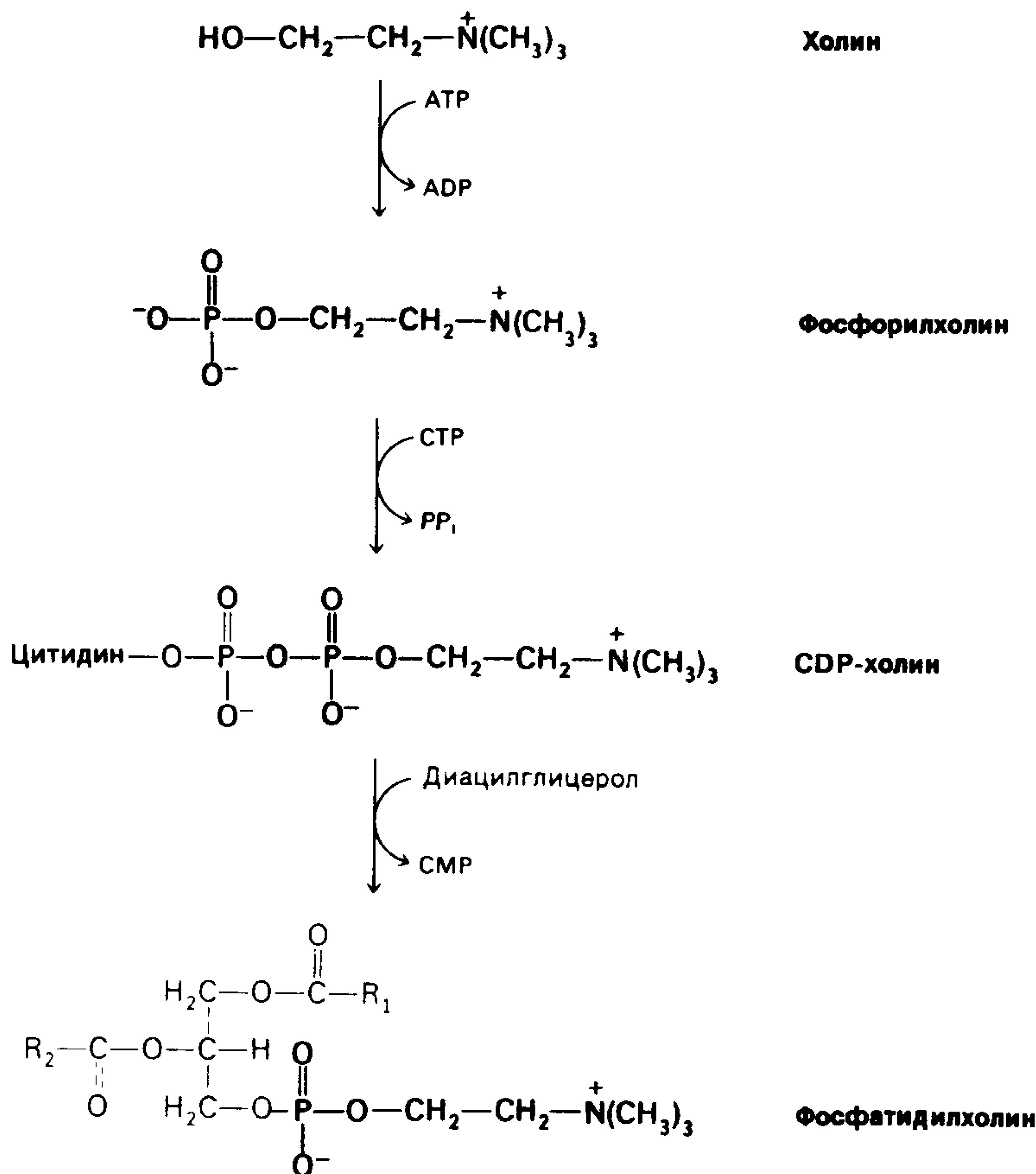


Рис. 20.2. Синтез фосфатидилхолина из готовых остатков.

14–31

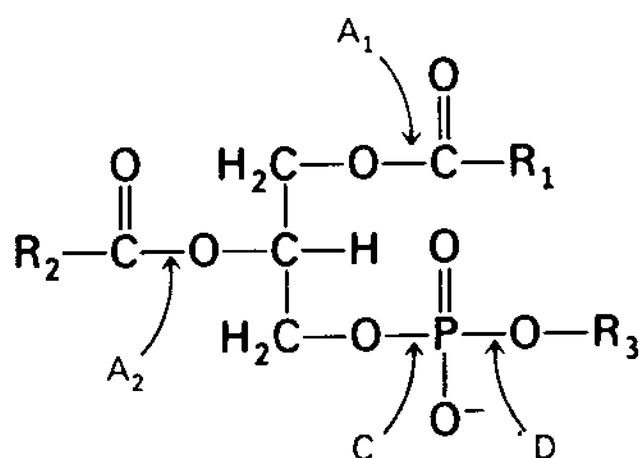
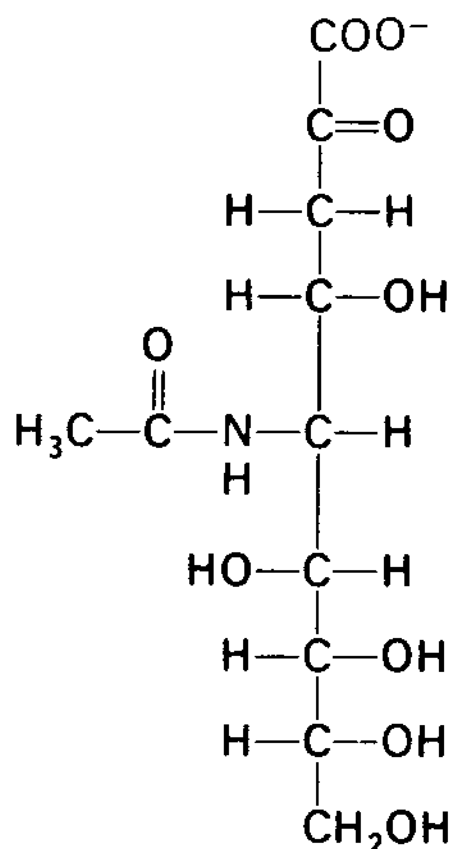
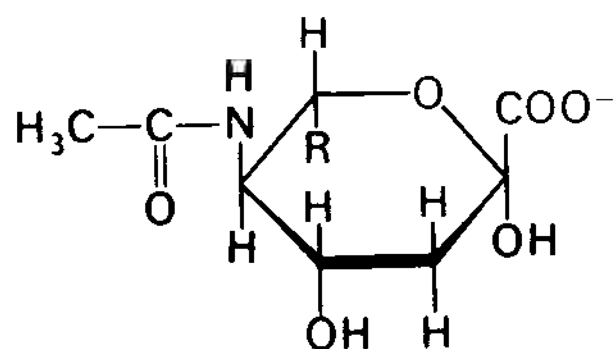


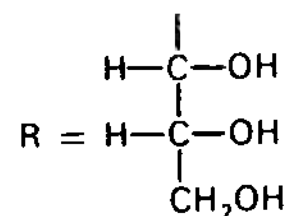
Рис. 20.3. Специфичность фосфолипаз.



N-ацетилнейраминовая кислота (форма с открытой цепью)

Ганглиозиды синтезируются путем упорядоченного последовательного присоединения остатков сахара к церамиду. Активированные доноры этих остатков сахара – UDP-глюкоза, UDP-галактоза и UDP-N-ацетилгалактозамин. CMP-производное N-ацетилнейрамината – активированный донор этого кислого сахара. CMP-N-ацетилнейраминат синтезируется из CTP и N-





N-ацетилнейраминовая кислота (пиранозная форма)

ацетилнейрамината; активированный атом углерода расположен в 1-м положении, как и в UDP-сахарах. Структура образующегося ганглиозида определяется специфичностью гликозилтрансфераз данной клетки. В общей сложности было описано более 15 различных ганглиозидов. На рис. 20.5 показана структура одного из них, G_{M1}.

20.8. Болезнь Тея–Сакса: наследуемое нарушение расщепления ганглиозидов

Ганглиозиды содержатся в наибольшей концентрации в нервной системе, особенно в сером веществе, где они составляют 6% всех липидов. Ганглиозиды постоянно синтезируются и расщепляются путем последовательного удаления концевых остатков сахара. Катализирующие эти реакции гликозид-гидролазы высокоспецифичны. Расщепление ганглиозидов происходит в *лизосомах.* Эти органеллы содержат самые

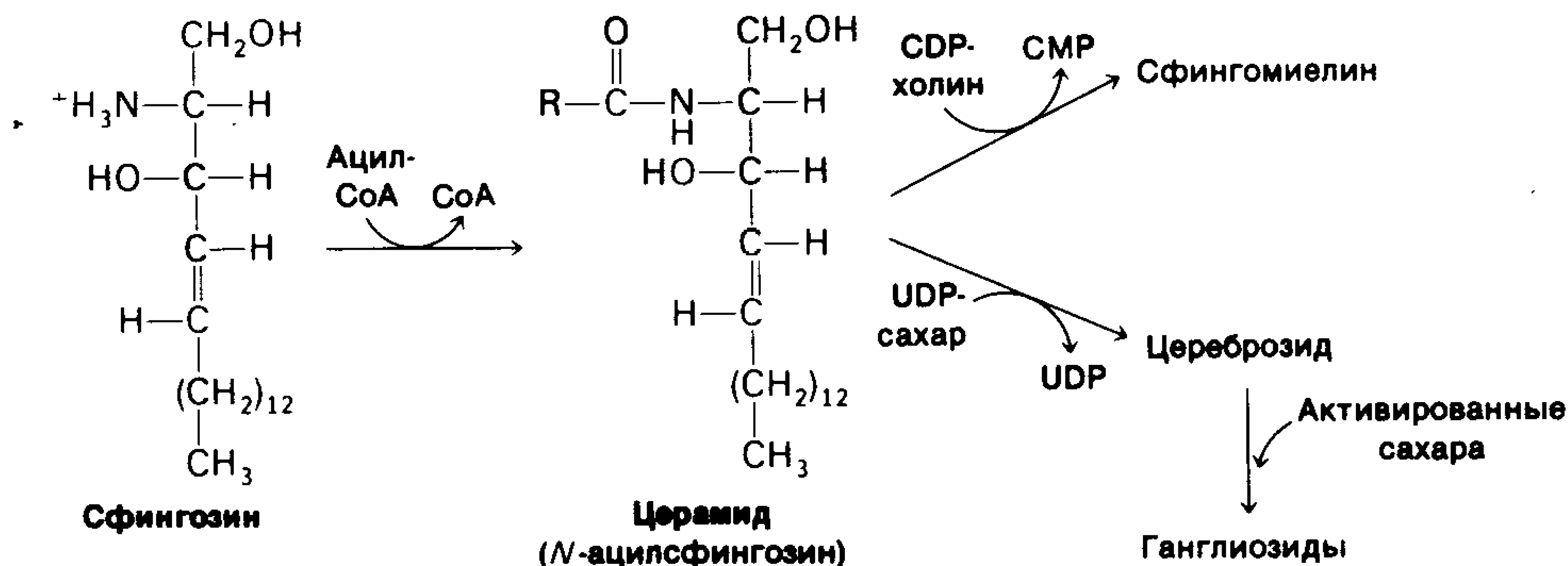


Рис. 20.4. Церамид – предшественник сфингомиелина и ганглиозидов.

разнообразные ферменты расщепления и предназначены для упорядоченного разрушения компонентов клетки.

Нарушения в способности клетки к расщеплению ганглиозидов могут привести к серьезным клиническим последствиям.

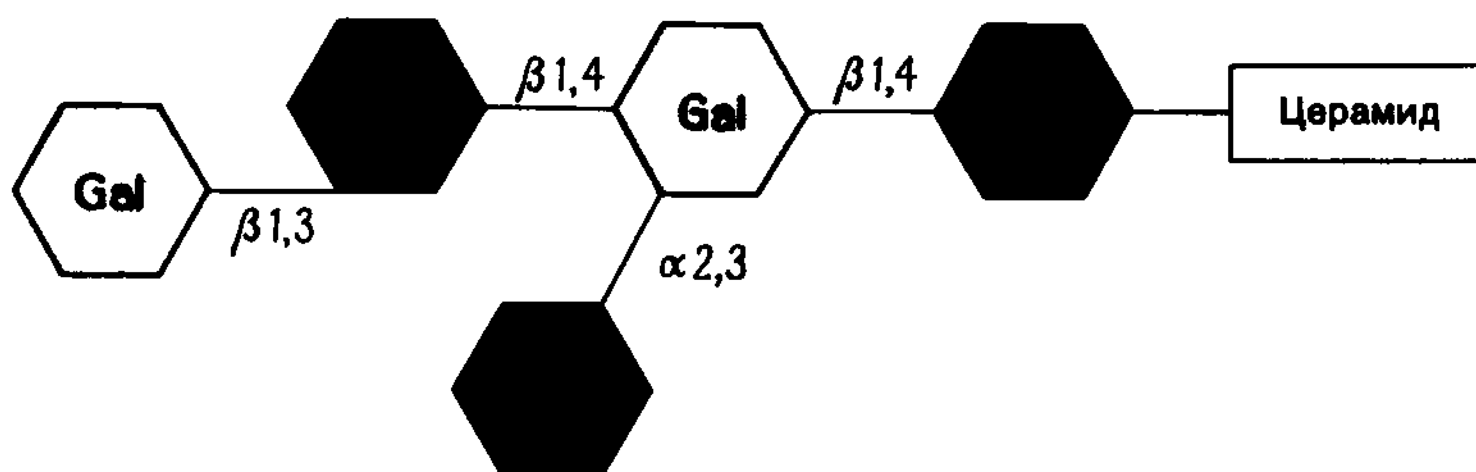


Рис. 20.5. Строение ганглиозида G_{M1}. Использованные сокращения: Gal – галактоза; GalNAc – ацетилгалактозамин; Glc – глюкоза; NAN – ацетилнейраминовая кислота. Над линиями, обозначающими связи между сахарами, указан тип этих связей, например β1,4.

Симптомы болезни Тея – Сакса обычно проявляются у ребенка в возрасте до одного года. К характерным ранним симптомам относятся слабость, отставание в развитии, затруднения при кормлении. Через несколько месяцев обычно наступает слепота. Летальный исход при болезни Тея – Сакса обычно наступает до 3 лет. Эта болезнь сопровождается разительными патологическими изменениями в нервной системе: ганглиозные клетки коры головного мозга и некоторых других участков мозга чрезмерно разбухают. Кроме того, на сетчатке видны отчетливые вишнево-красные пятна.

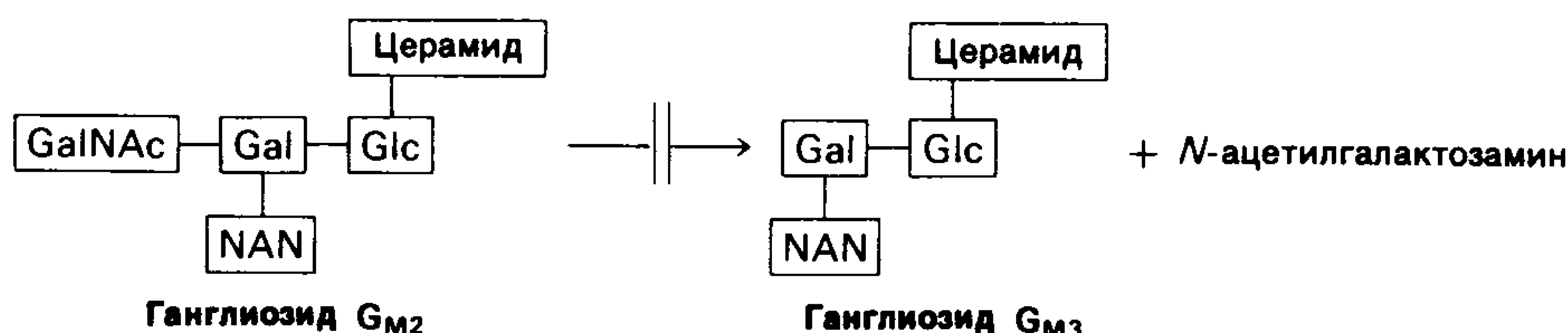
Содержание ганглиозидов в мозгу ребенка, страдающего болезнью Тея – Сакса, сильно повышено. Особенно сильно, *во много раз по сравнению с нормой, повышается концентрация ганглиозида* G_{M2}. Аномально высокое содержание этого ганглиозида обусловлено недостаточностью фермента, отщепляющего концевой остаток *N*-ацетилгалактозамина. Фермент, отсутствие (или недостаточная активность)



Рис. 20.6. Электронная микрофотография лизосомы. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

которого обусловливают эту болезнь,– специфическая *β-N-ацетилгексозаминидаза.*

Болезнь Тея – Сакса наследуется как *аутосомный рецессивный* признак. Частота носителей составляет 1/30 среди американцев еврейского происхождения и 1/300 среди прочих американцев. Следовательно, частота болезни среди американцев еврейского происхождения выше примерно в 100 раз. Болезнь Тея – Сакса можно диагносцировать еще во время эмбрионального развития. Для этого берут пробу амниотиче-



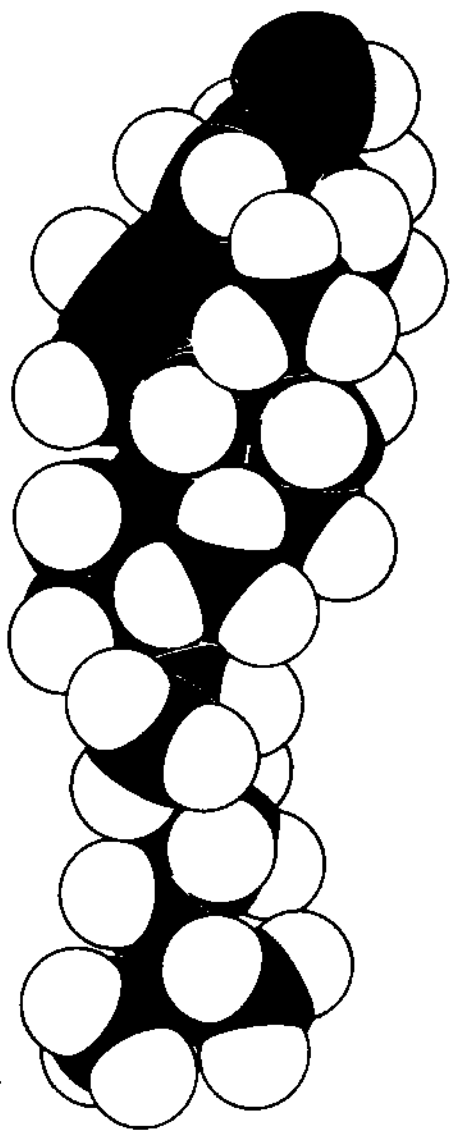
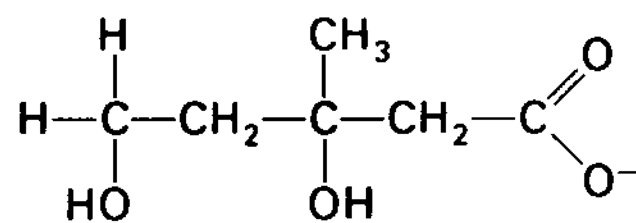


Рис. 20.7. Пространственная модель холестерола.

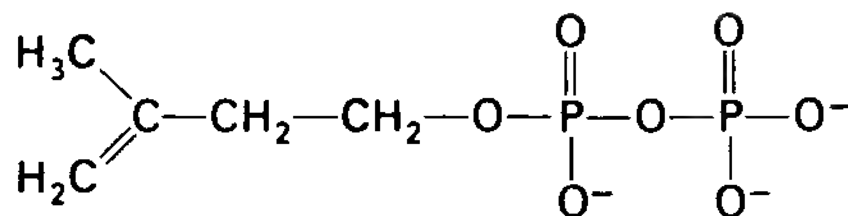
ской жидкости с помощью *амниоцентеза* и определяют в ней активность β-N-ацетилгексозаминидазы.

20.9. Холестерол синтезируется из ацетил-кофермента А

Теперь обратимся к синтезу холестерола – стероида, регулирующего текучесть мембран эукариотической клетки (разд. 10.17). Кроме того, холестерол служит предшественником стероидных гормонов, таких, как прогестерон, тестостерон, эстрадиол и кортизол. Важный шаг в ранних исследованиях синтеза холестерола сделал Конрад Блох (Konrad Bloch) в 40-х годах. Он приготовил ацетат, содержащий меченые атомы углерода, и скормил его крысам. Холестерол, синтезированный в организме этих крыс, содержал изотопную метку, откуда следовало, что ацетат – предшественник холестерола. Действительно, *все 27 атомов углерода холестерола происходят из ацетил-СоА.* Дальнейший прогресс в изучении синтеза холестерола был достигнут



Мевалонат

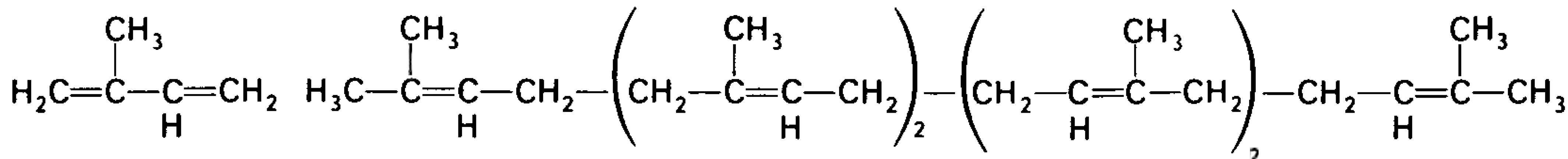


Изопентенилпирофосфат

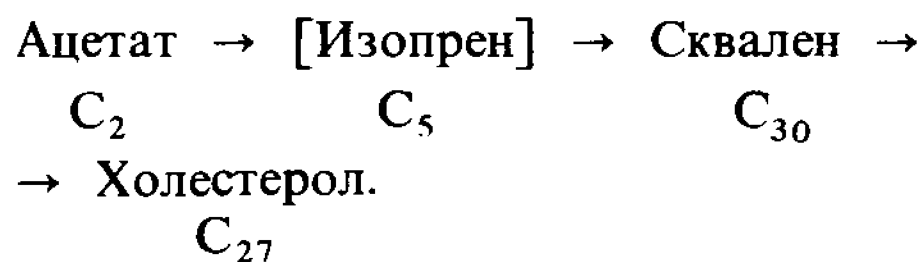
использованием в качестве предшественника ацетата, меченного по метильному или карбоксильному атому углерода. При расщеплении холестерола, синтезированного из ацетата, меченного по одному из атомов углерода, удалось установить происхождение каждого атома в молекуле (рис. 20.8). Это сыграло решающую роль в создании и экспериментальной проверке гипотез о пути синтеза холестерола.

20.10. Мевалонат и сквален – промежуточные продукты синтеза холестерола

Следующим важным достижением было открытие *сквалена,*– C_{30}-углеводорода, промежуточного продукта синтеза холестерола. Сквален состоит из шести *изопреновых* единиц. Открытие сквалена породило следующую проблему: каким образом синтезируются из ацетата изопреновые единицы.



Изопрен **Сквален**



Ответ был неожиданно получен из работ, посвященных исследованию бактериальных мутантов и не имевших никакого отношения к изучению синтеза холестерола. Оказалось, что мевалонат может заменять ацетат, компенсируя его недостаток у мутантов, нуждающихся в ацетате. Открытие мевалоната имело решающее значение для расшифровки пути биосинтеза холестерола, так как вскоре стало ясно, что эта шестиуглеродная кислота может

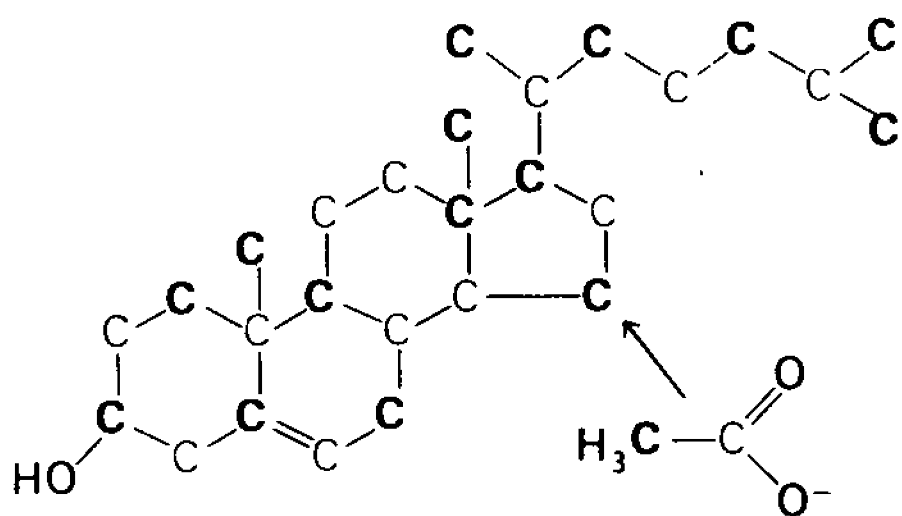
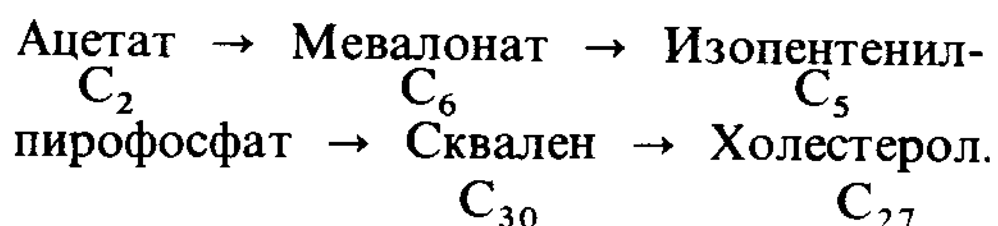


Рис. 20.8. Распределение метки в молекуле холестерола, синтезированного из ацетата, меченного по метильному (показано синим цветом) или карбоксильному (показано красным цветом) атомам углерода.

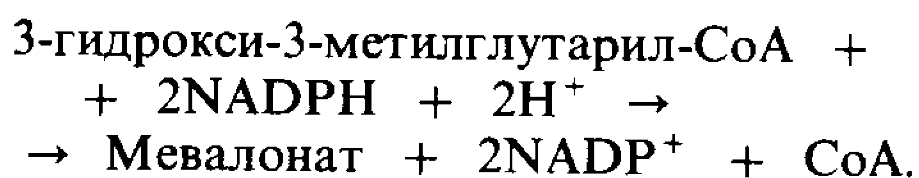
декарбоксилироваться и давать таким образом постулированный пятиуглеродный изопреновый промежуточный продукт. Затем с помощью изотопной метки было показано, что мевалонат действительно служит предшественником сквалена и что он может образовываться из ацетата. Оказалось, что активированный изопреновый промежуточный продукт – *изопентенилпирофосфат*, который образуется путем декарбоксилирования производного мевалоната. Итак, схематически синтез холестерола из ацетата можно было представить следующим образом:


Ацетат (C_2) → Мевалонат (C_6) → Изопентенилпирофосфат (C_5) → Сквален (C_{30}) → Холестерол (C_{27}).

20.11. Синтез изопентенилпирофосфата – активированного промежуточного продукта при образовании холестерола

Первый этап синтеза холестерола – образование изопентенилпирофосфата из ацетил-CoA. Эта серия реакций начинается с образования 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA из ацетил-CoA и ацетоацетил-CoA. Одно из возможных превращений 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA, его расщепление на ацетил-CoA и ацетоацетат, обсуждалось ранее в связи с образованием кетоновых тел (разд. 17.12). Другая возможность – восстановление 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA до мевалоната (рис. 20.9). 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA присутствует в клетках печени как в цитозоле, так и в митохондриях. Митохондриальный фонд этого промежуточного продукта служит в основном предшественником кетоновых тел, а цитоплазматический фонд дает мевалонат для синтеза холестерола.

Синтез мевалоната неизбежно приводит в конечном счете к синтезу холестерола. Эта необратимая стадия, катализируемая 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA—редуктазой – важный регуляторный этап в биосинтезе холестерола. Этот механизм регуляции будет рассмотрен несколько позже.


3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA + 2NADPH + $2H^+$ → Мевалонат + $2NADP^+$ + CoA.

Мевалонат превращается в 3-фосфо-5-пирофосфомевалонат в результате трех по-

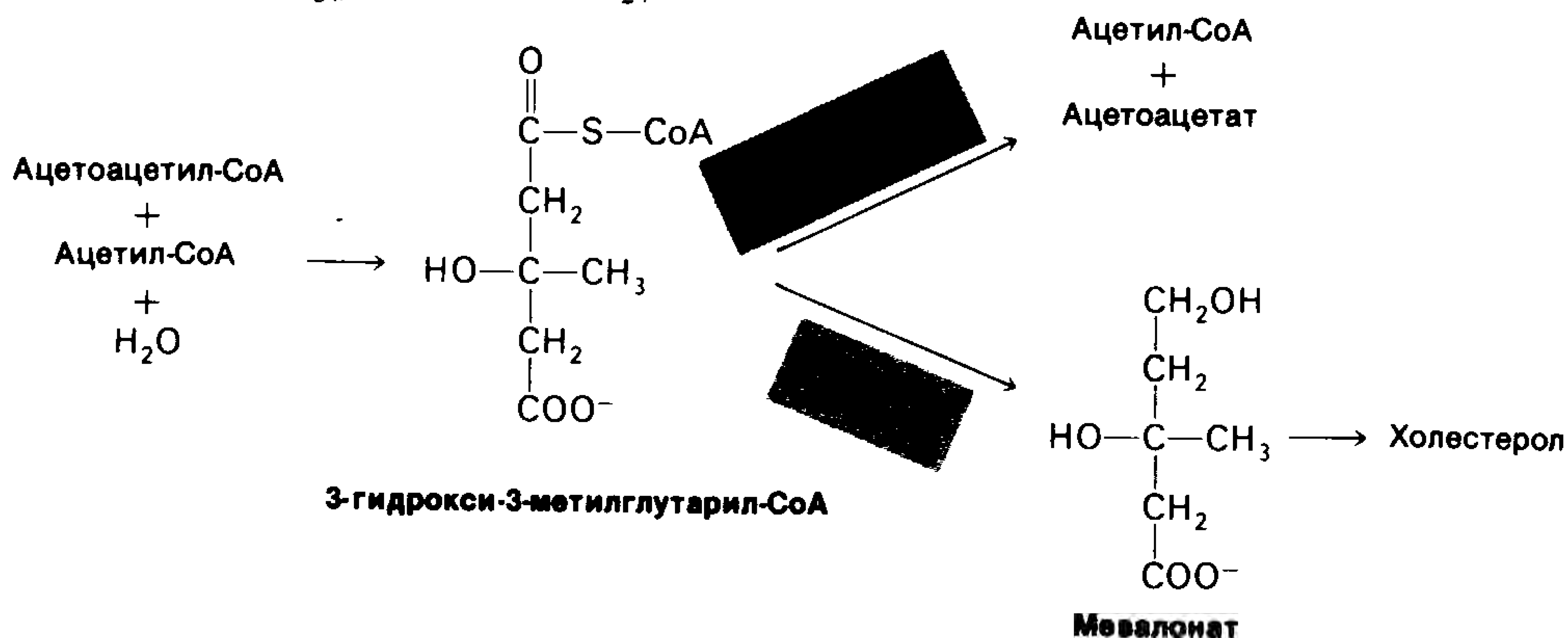


Рис. 20.9. Синтез и последующие превращения 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA.

следовательных реакций фосфорилирования. Этот лабильный промежуточный продукт теряет CO_2 и P_i и превращается в *3-изопентенилпирофосфат* (рис. 20.10).

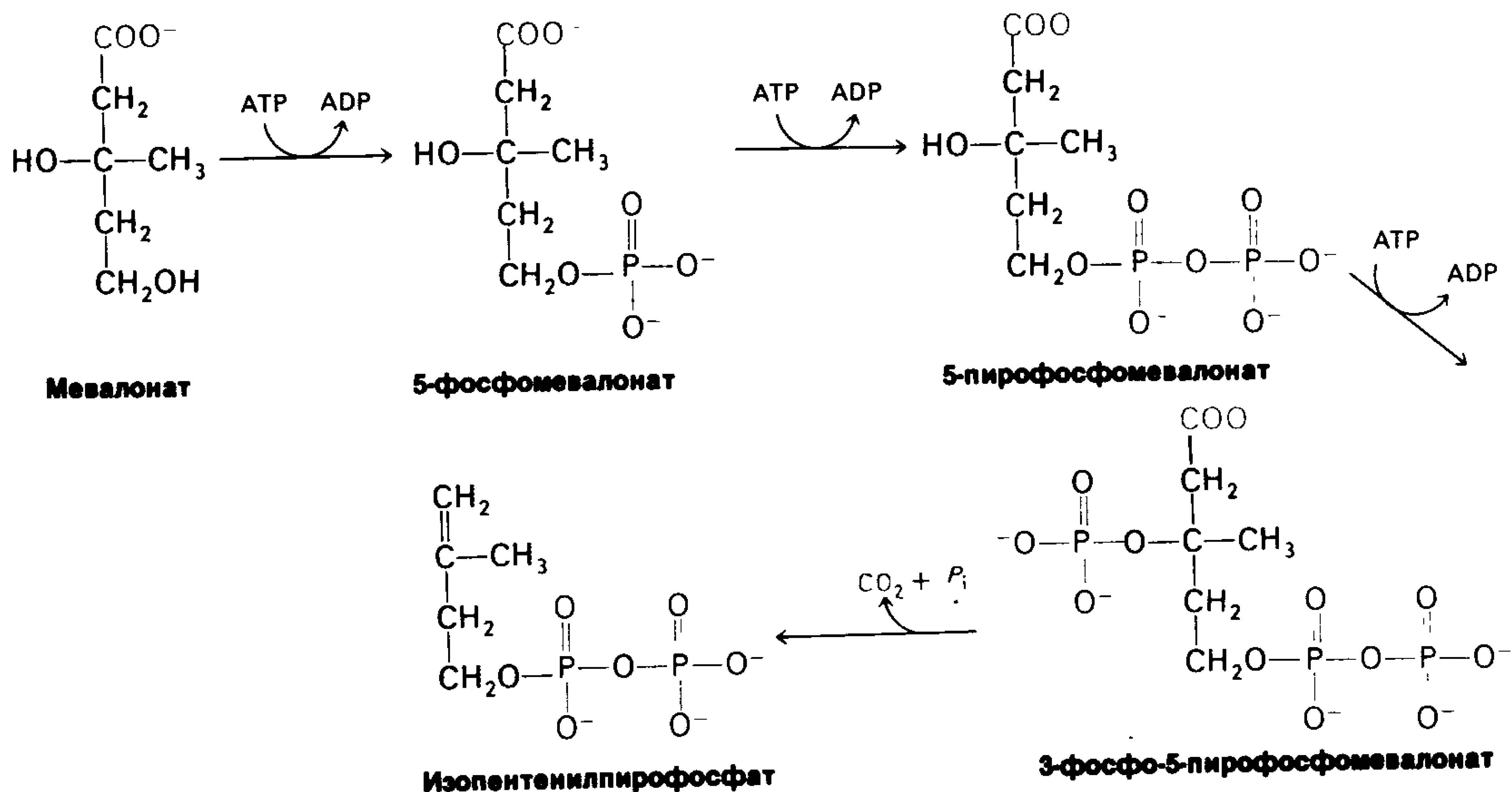
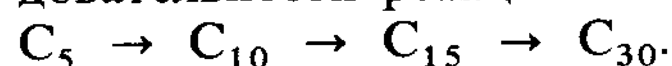


Рис. 20.10. Синтез изопентенилпирофосфата из мевалоната.

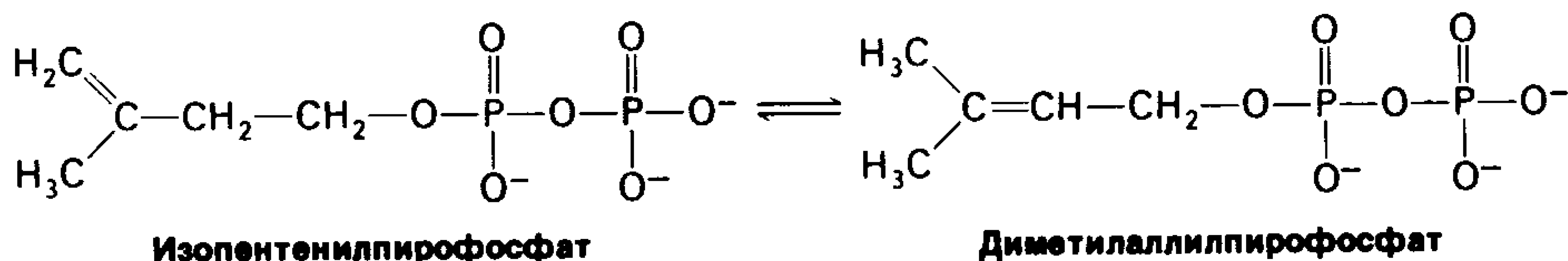
20.12. Синтез сквалена из изопентенилпирофосфата

Сквален синтезируется из изопентенилпирофосфата в результате следующей последовательности реакций:

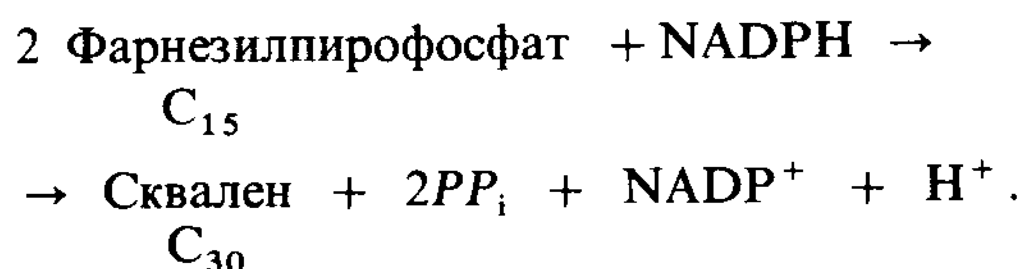


$C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15} \rightarrow C_{30}$.

Данный путь синтеза холестерола (рис. 20.11) начинается с изомеризации *изопентенилпирофосфата в диметилаллилпирофосфат*. Эти два пятиуглеродных соединения образуют при конденсации *геранилпирофосфат* (C_{10}), который конденсируется еще с одной молекулой изопентенилпирофосфата, давая *фарнезилпирофосфат* (C_{15}). Последний этап в синтезе *сквалена*—восстановительная конденсация двух молекул



фарнезилпирофосфата:



$$2 \text{ Фарнезилпирофосфат } + \text{NADPH} \rightarrow$$
$$C_{15}$$
$$\rightarrow \text{ Сквален } + 2PP_i + \text{NADP}^+ + \text{H}^+.$$
$$C_{30}$$

20.13. 2,3-оксид сквалена циклизуется с образованием ланостерола, который в свою очередь превращается в холестерол

Последний этап биосинтеза холестерола начинается с циклизации сквалена (рис. 20.14). В отличие от предшествующих реакций этот этап биосинтеза холестерола *требует участия молекулярного кислорода.* В реакции образования промежуточного продукта 2,3-оксида сквалена участвуют O_2 и NADPH. Затем оксид сквалена циклизуется под действием циклазы в *ланостерол*. Эта замечательная реакция замыкания цикла сопровождается совместным перемещением электронов через четыре двойные связи и миграцией двух метильных групп. Наконец, ланостерол превращается в *холестерол* путем удаления трех метильных групп, восстановления одной двойной связи с участием NADPH и перемещения еще одной двойной связи. Интересно отметить, что холестерол возник только после того, как земная атмосфера стала аэробной. Холестерол распространен повсеместно среди эукариот, но отсутствует у большинства прокариот.

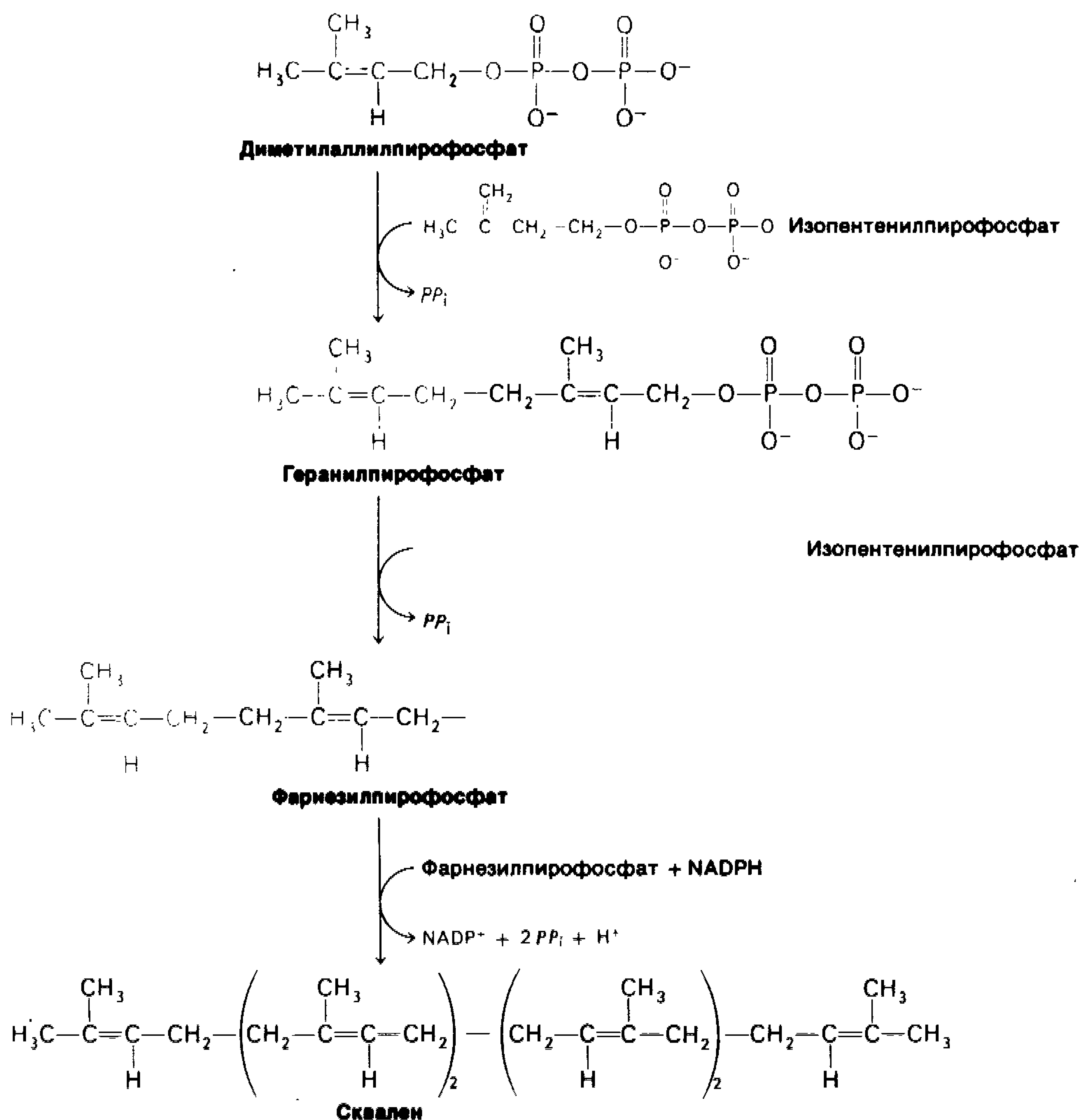


Рис. 20.11. Синтез сквалена из диметилаллилпирофосфата, изомера изопентенилпирофосфата.

20.14. Желчные кислоты, облегчающие переваривание липидов, образуются из холестерола

Желчные кислоты – полярные производные холестерола. Эти соединения относятся к высокоэффективным *детергентам*, так как содержат полярные и неполярные группы. Желчные кислоты синтезируются в печени, запасаются и концентрируются в желчном пузыре и затем выделяются в тонкий кишечник. Желчные кислоты – основной компонент желчи; *они солюбилизируют липиды, поступающие* в кишечник *с пищей*. Происходящее в результате увеличение поверхности липидов приводит к двум последствиям: стимулирует гидролиз липидов липазами и облегчает их всасывание. Кроме того, желчные кислоты – основной продукт распада холестерола.

Холестерол превращается в триоксикопростановую кислоту и затем в *холил-СоА*, активированный промежуточный продукт желчных кислот (рис. 20.15). Затем активированный карбоксильный углерод холил-СоА реагирует с аминогруппой глицина и образует *гликохолат* или с аминогруппой таурина ($H_2N—CH_2—CH_2—SO_3^-$) и образует *таурохолат*. *Гликохолат – основная желчная кислота.*

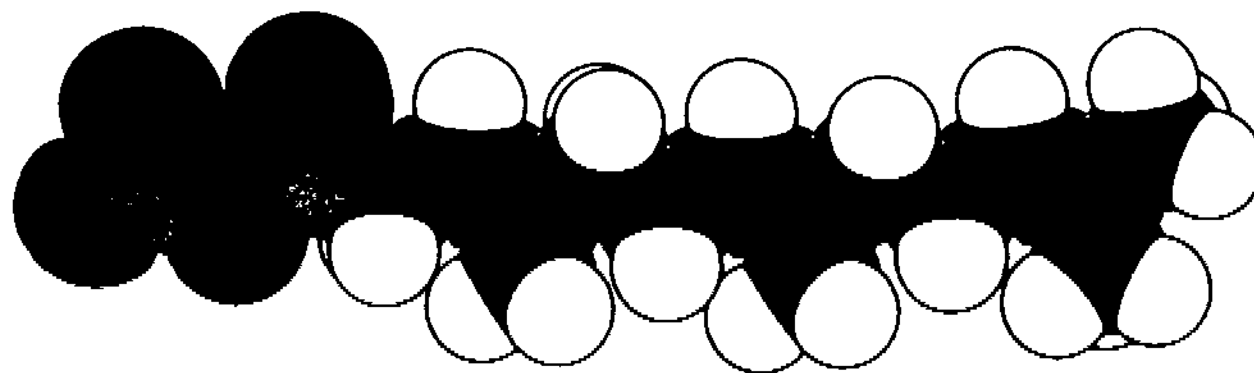


Рис. 20.12. Пространственная модель фарнезилпирофосфата.

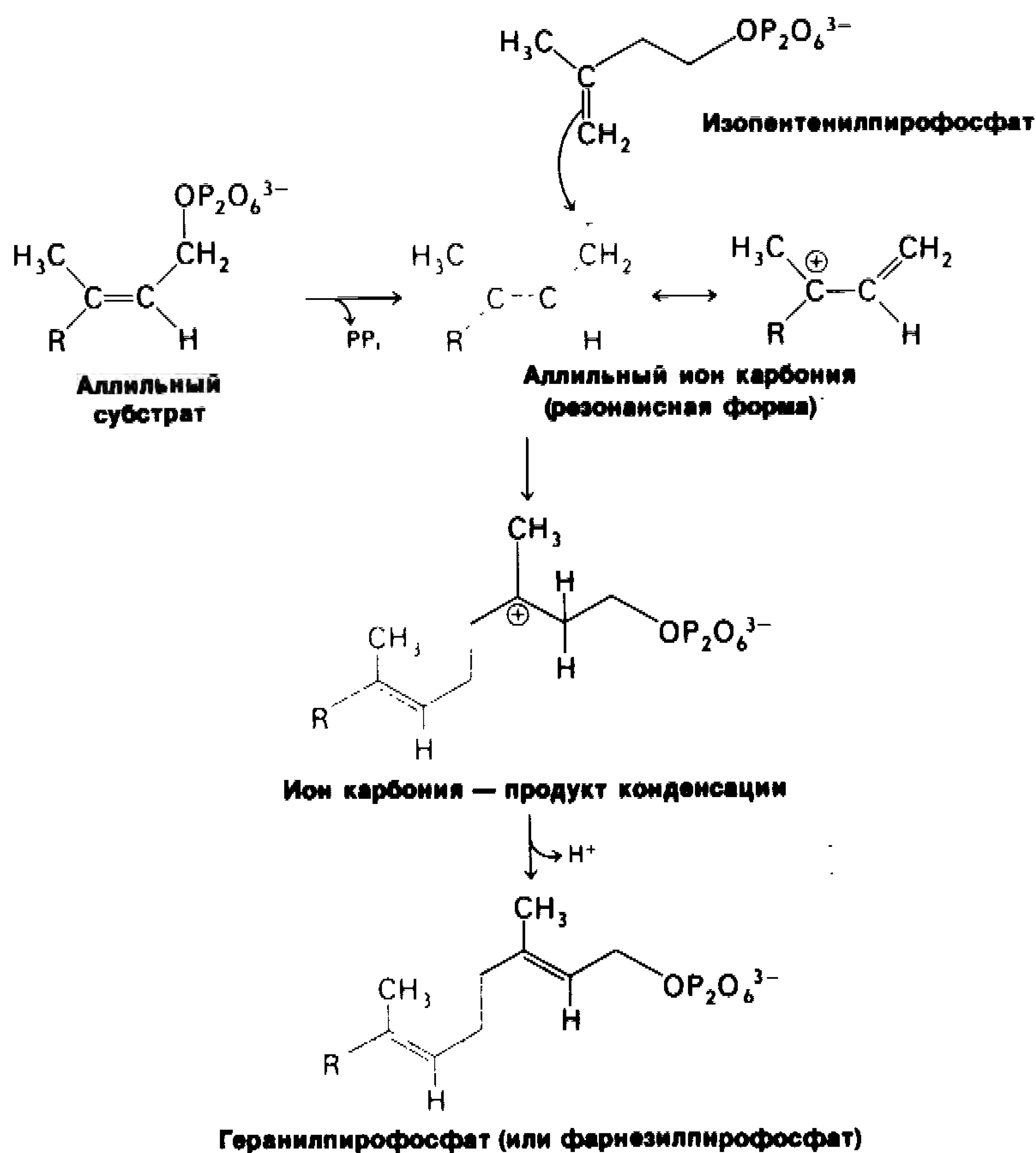


Рис. 20.13. Предполагаемый механизм присоединения аллильных субстратов (например, диметилаллилпирофосфата или геранилпирофосфата) к изопентенилпирофосфату по схеме «голова к хвосту». Три стадии этого процесса - реакции ионизации, конденсации и элиминирования.

20.15. Синтез холестерола в печени подавляется холестеролом, поступающим с пищей

Холестерол может поступать с пищей или синтезироваться de novo. Основное место синтеза холестерола у млекопитающих — печень. Кроме того, довольно значительное количество холестерола синтезируется в кишечнике. В норме в организме взрослого человека, получающего обедненный холестеролом рацион, синтезируется около 80 мг холестерола в сутки. Скорость обра-

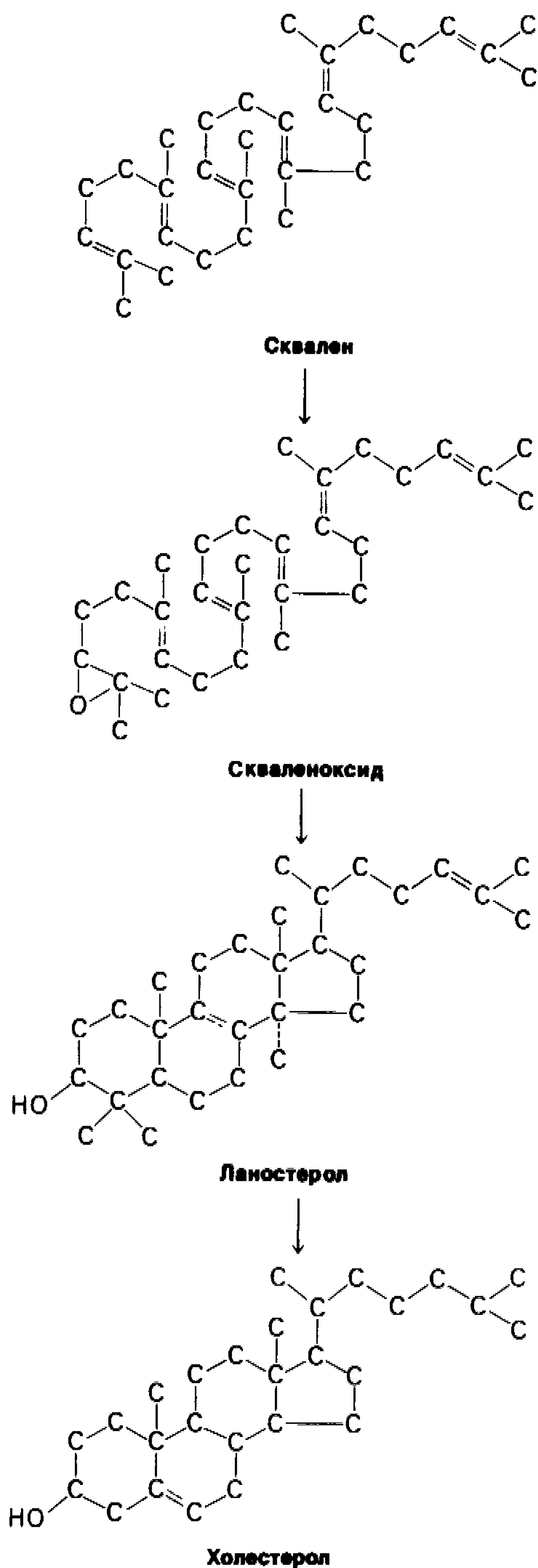


Рис. 20.14. Синтез холестерола из сквалена.

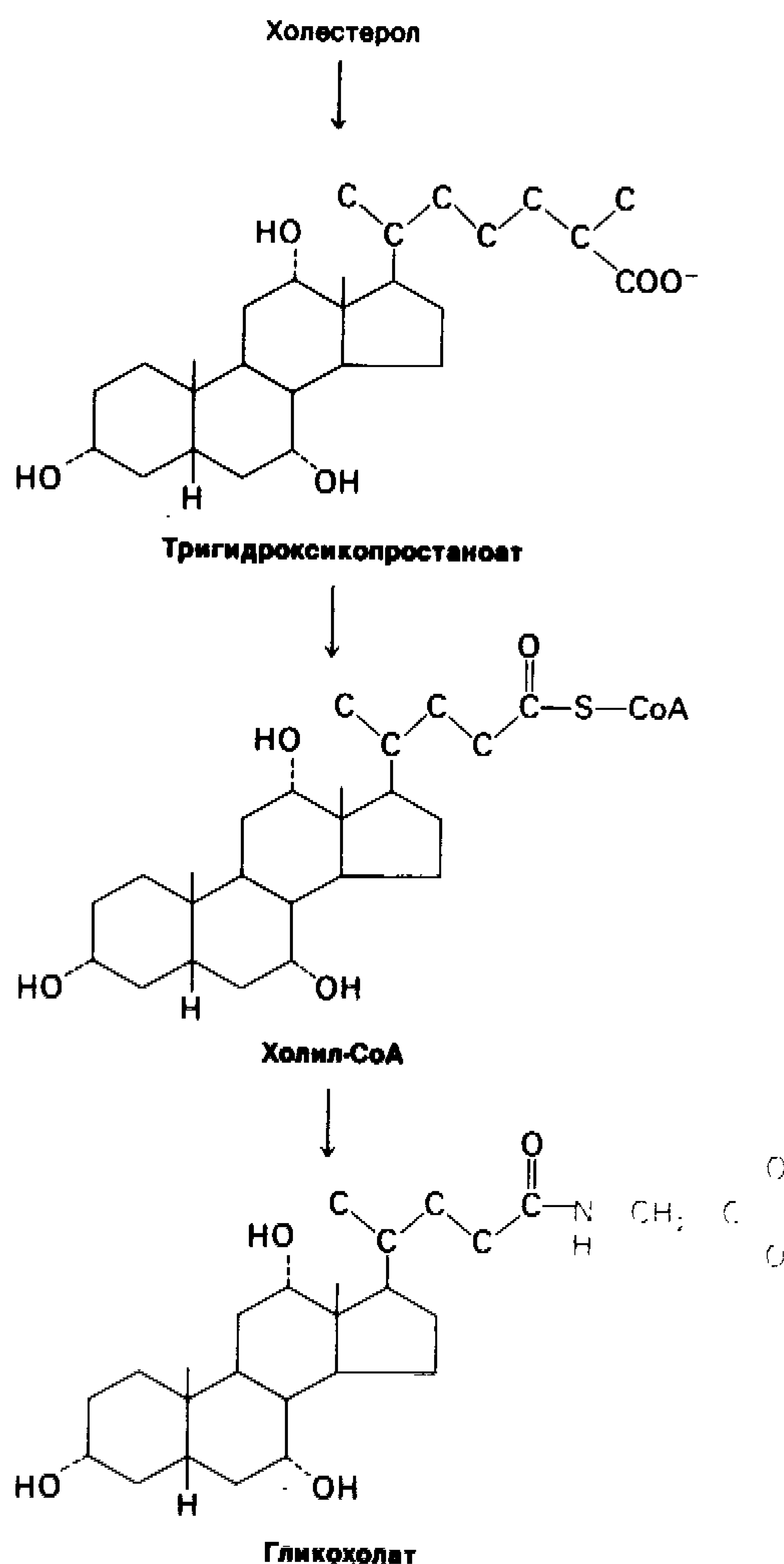


Рис. 20.15. Синтез гликохолата – основной желчной кислоты.

зования холестерола в этих органах в большой степени зависит от количества холестерола, потребляемого с пищей. *Этот регуляторный механизм обратной связи действует путем изменения активности 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА*—редуктазы. Как говорилось выше, данный фермент катализирует образование мевалоната – реакцию, с которой начинается путь биосинтеза холестерола. Поступающий с пищей холестерол подавляет синтез редуктазы в печени и приводит к инактивации уже существующих молекул фермента.

20.16. Холестерол и другие липиды переносятся к органам-мишеням с помощью различных липопротеинов

Холестерол, триацилглицеролы и другие липиды транспортируются жидкостями организма с помощью ряда липопротеинов, которые классифицируют по плотности (в порядке возрастания) (табл. 20.1): *хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (*ЛОНП*), липопротеины низкой плотности* (ЛНП) *и липопротеины высокой плотности* (ЛВП). Эти липопротеины состоят из гидрофобного липидного ядра, окруженного полярными липидами и оболочкой из апобелков. К настоящему времени выделено и охарактеризовано восемь типов апобелков: апо-A-I, апо-A-II, апо-B, апо-C-I, апо-C-II, апо-C-III, апо-D и апо-E. Эти комплексы *солюбилизируют сильногидрофобные липиды.* Кроме того, белки входящие в состав этих комплексов, несут сигналы, *регулирующие поступление определенных липидов в специфические ткани-мишени и выход липидов из этих тканей.*

Липопротеины плазмы синтезируются и секретируются печенью и кишечником. *Хиломикроны,* самые крупные липопротеины, переносят триацилглицеролы, холестерол и другие липиды пищи из кишечника в жировую ткань и печень. Они имеют очень низкую плотность ($< 0,94$ г/см^3), так как богаты триацилглицеролами, и содержат менее 2% белка. Триацилглицеролы в составе хиломикронов за несколько минут гидролизуются липазами в капиллярах жировой ткани и других периферических тканей. Обогащенные холестеролом остатки хиломикронов, так называемые остаточные частицы, поглощаются печенью. *Липопротеины очень низкой плотности* синтезируются главным образом в печени. ЛОНП доставляют новосинтезированные в организме триацилглицеролы к жировой ткани. Те ЛОНП, которые не попадают в жировую ткань, превращаются в *липопротеины низкой плотности,* богатые эфирами холестерола. Бóльшая часть холестерола в ЛНП находится в виде эфира линолевой кислоты – полиеновой жирной кислоты. Роль ЛНП заключается в переносе холестерола к периферическим тканям и регуляции синтеза холестерола de novo в этих тканях; этот аспект мы рассмотрим ниже. *Липопротеины высокой плотности* синтезируются в печени; они богаты фосфолипидами и холестеролом. Одна из функций ЛВП состоит в переносе холестерола от периферических тканей к печени.

Таблица 20.1. **Липопротеины плазмы**

Тип	Плотность, г/см^3	Главные полипептиды
Хиломикроны	$<0,94$	Апо-A, апо-B, апо-C
Липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП)	0,940–1,006	Апо-B, апо-C, апо-E
Липопротеины низкой плотности (ЛНП)	1,006–1,063	Апо-B
Липопротеины высокой плотности (ЛВП)	1,063 1,210	Апо-A

20.17. Рецепторы липопротеинов низкой плотности играют ключевую роль в регуляции метаболизма холестерола

Холестерол – компонент всех клеточных мембран эукариот. Он необходим для роста и существования клеток высших организмов. Однако избыток холестерола может оказаться губительным для организма из-за атеросклероза – отложения бляшек эфиров холестерола. Очевидно, что метаболизм холестерола должен тонко регулироваться. Механизмы регуляции в печени – основном месте синтеза холестерола – уже обсуждались: холестерол, поступающий с пищей, снижает активность и количество 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA—редуктазы – фермента, катализирующего решающий этап биосинтеза. Исследования человеческих фибробластов в культуре, проведенные Майклом Брауном и Джозефом Голдстайном (Michael Brown, Joseph Goldstein), пролили свет на регуляцию метаболизма холестерола в других клетках. Как правило, клетки, находящиеся вне печени и кишечника, получают холестерол из сыворотки крови, а не синтезируют его de novo. Точнее, *основной источник холестерола – липопротеины низкой плотности.* Поглощение клеткой холестерола в составе ЛНП включает следующие этапы:

1. ЛНП связывается со специфическим

рецептором на плазматической мембране клеток вне печени. Рецепторы для ЛНП располагаются в особых участках, которые называются *«окаймленные рецепторные ямки»* (coated pits) и содержат *клатрин* (разд. 29.32).

2. Комплекс рецептор—ЛНП проникает в клетку путем *эндоцитоза*, т. е. клеточная мембрана вблизи комплекса втягивается и затем ее края сливаются, образуя эндоцитозный пузырек (рис. 20.16).

3. Пузырьки, содержащие ЛНП, сливаются с *лизосомами*, в которых имеется множество самых разнообразных гидролитических ферментов. Белковый компонент ЛНП гидролизуется до свободных аминокислот. Эфиры холестерола в составе ЛНП гидролизуются кислой липазой лизосом.

4. *Высвободившийся неэтерифицированный холестерол может быть использован в биосинтезе мембран.* Кроме того, он может *реэтерифицироваться для запасания в клетке.* Холестерол активирует ацил-CoA: холестерол—ацилтрансферазу, фермент, катализирующий эту реакцию. Реэтерифицированный холестерол связан преимущественно с олеатом или пальмитолеатом—моноеновыми кислотами (т. е. жирными кислотами с одной ненасыщенной связью) в отличие от эфиров холестерола в составе ЛНП, которые обогащены полиеновой линолевой кислотой.

Содержание холестерола в клетках, в которых активно идет процесс усвоения ЛНП, регулируется двумя путями. Во-первых, *высвобождающийся холестерол подавляет образование 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA—редуктазы, ингибируя таким образом синтез холестерола de novo.* Во-вторых, сам рецептор ЛНП регулируется по механизму обратной связи. В фибробластах время полужизни рецептора ЛНП—около суток. *Если в клетках имеется избыток холестерола, новые рецепторы ЛНП не синтезируются, и тем самым блокируется поступление новых порций холестерола из ЛНП плазмы крови.*

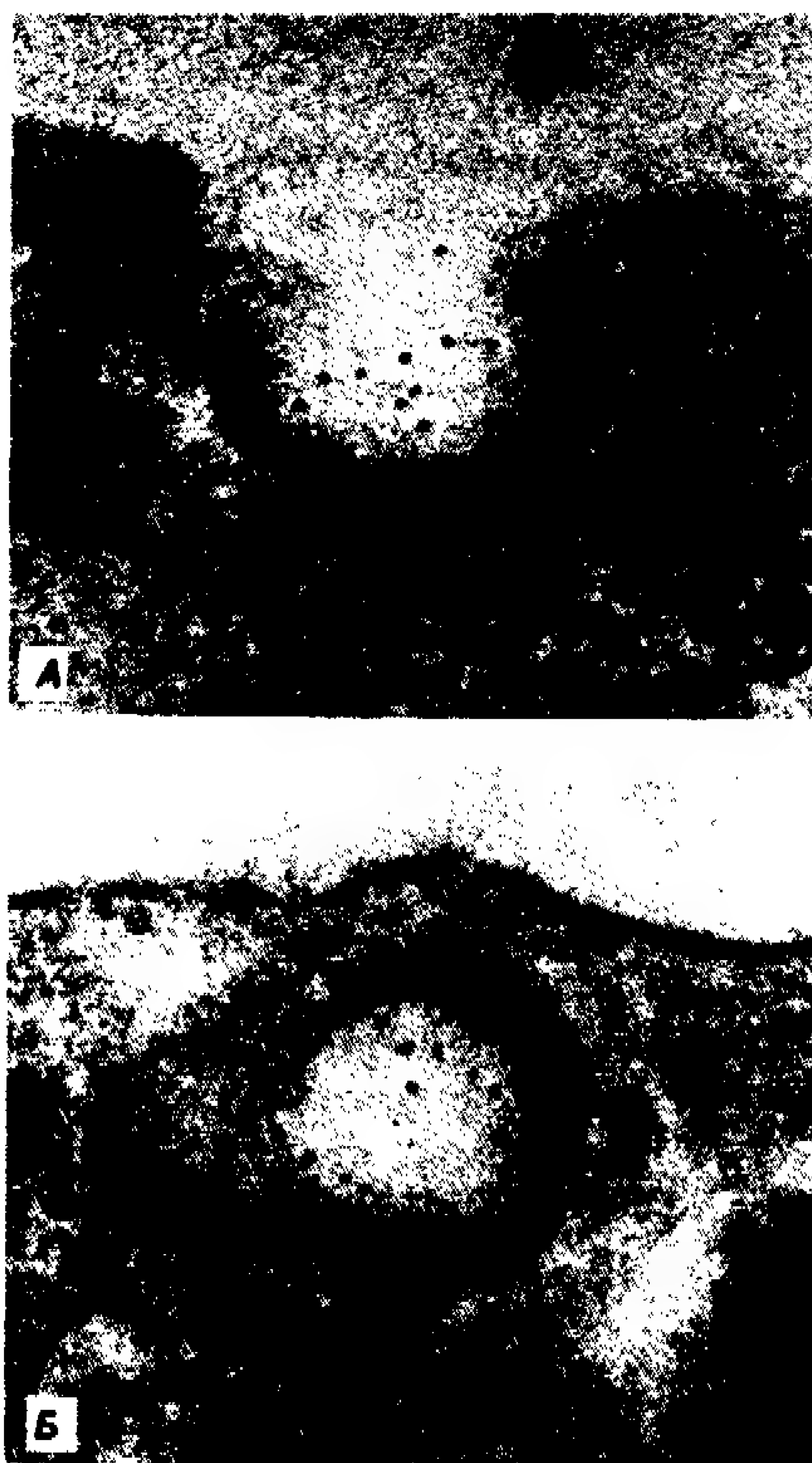


Рис. 20.16. Эндоцитоз ЛНП, связанных с соответствующим рецептором на поверхности фибробластов человека в культуре (ЛНП сделаны видимыми путем присоединения ферритина). *А*—электронная микрофотография; виден ЛНП-ферритин (темные точки), связанный с окаймленной рецепторной ямкой на клеточной поверхности; *Б*—этот участок в ходе эндоцитоза инвагинируется и образует эндоцитозный пузырек. [Anderson R. G. W., Brown M. J., Goldstein J. L., Cell, **10**, 351 (1977), MIT press.]

20.18. Отсутствие рецепторов ЛНП приводит к гиперхолестеролемии и преждевременному атеросклерозу

Исследования *семейной гиперхолестеролемии* указывают на важную роль рецепторов ЛНП. При этом нарушении общая концентрация холестерола и ЛНП в сыворотке крови заметно увеличена. Это результат мутации в одном-единственном аутосомном локусе. Содержание холестерола в сыворотке гомозиготных больных составляет обычно 6,8 г/л, у гетерозиготных—3 г/л, а в норме равно 1,75 г/л. *Из-за того что концентрация ЛНП, содержащих*

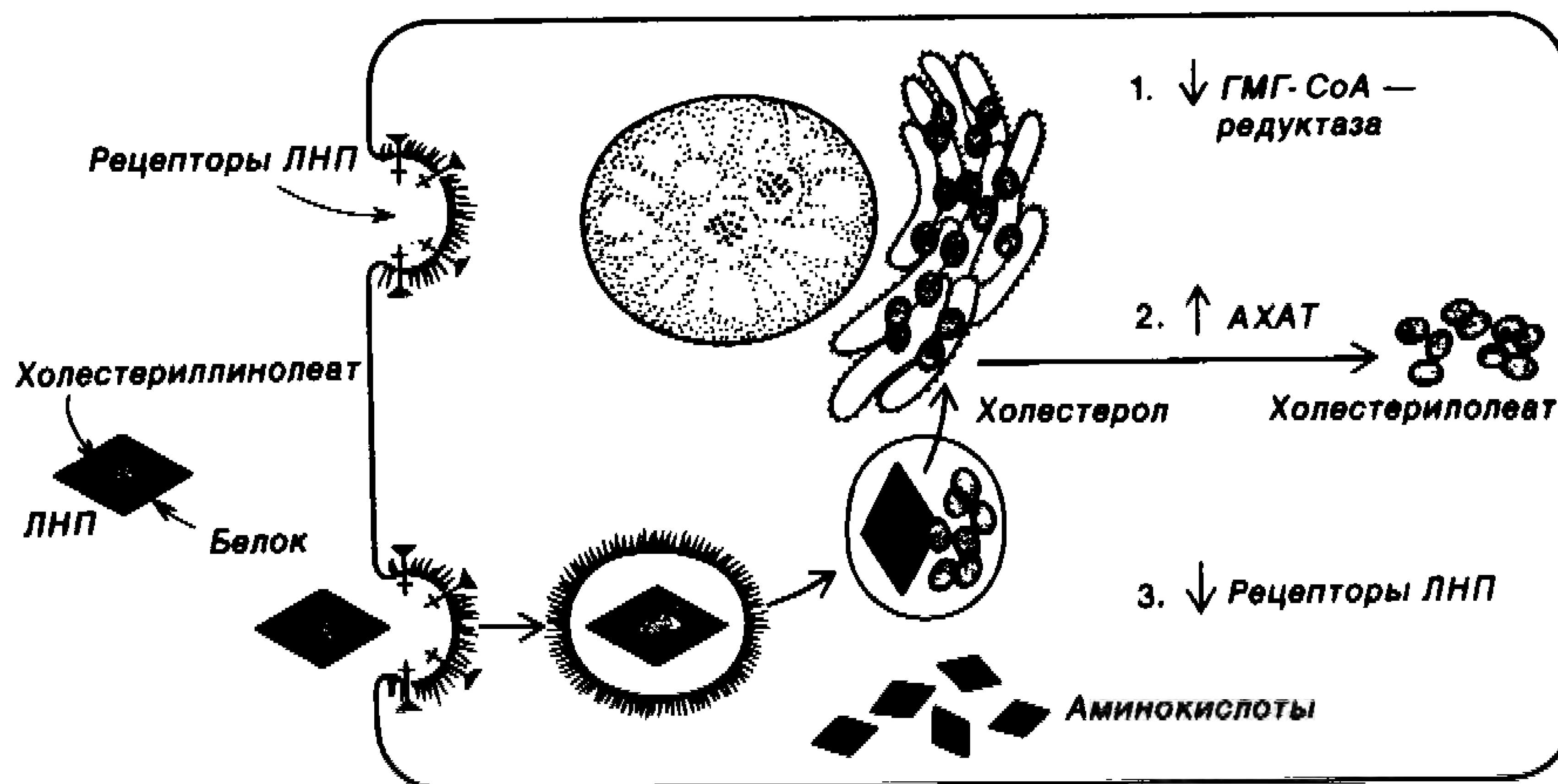


Рис. 20.17. Превращения липопротеинов низкой плотности в культивируемых фибробластах человека. ГМГ-СоА—редуктаза—3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА—редуктаза; АХАТ–ацил-СоА:холестерол-ацилтрансфераза. (Печатается с любезного разрешения д-ра Michael Brown и д-ра Joseph Goldstein.)

холестерол, в плазме крови увеличена, холестерол откладывается в различных тканях. Гранулы холестерола называют *ксантомами*; они часто встречаются в коже и сухожилиях. Более опасно отложение холестерола в бляшках на стенках артерий, приводящее к атеросклерозу. *Большинство гомозиготных больных гиперхолестеролемией погибает в детстве из-за поражения коронарных сосудов.* У гетерозигот наблюдаются различные формы заболевания, и в целом оно протекает легче. *В большинстве случаев семейной гиперхолестеролемии молекулярное нарушение состоит в отсутствии или нехватке активных рецепторов ЛНП.* У гомозигот таких рецепторов почти нет, а у гетерозигот их количество примерно вдвое меньше нормы. Вследствие этого проникновение ЛНП в клетки различных тканей вне печени нарушено, и содержание ЛНП в сыворотке крови увеличено. Кроме того, наследственная гиперхолестеролемия может возникать из-за нарушения переноса комплекса ЛНП—рецептор внутрь клеток.

20.19. Номенклатура стероидов

Прежде чем перейти к синтезу стероидных гормонов, необходимо сделать несколько замечаний о номенклатуре стероидов. Атомы углерода в стероидах нумеруются так, как указано на рис. 20.18 на примере холестерола. Кольца стероидной молекулы обозначаются латинскими буквами А, В, С и D. Холестерол содержит две боковые метильные группы: метильная группа С-19 присоединена к С-10, а метильная группа С-18–к С-13. Химические связи над С-10 и С-13 обозначают эти метильные группы. Метильные группы холестерола С-18 и С-19 по определению расположены *над* плоскостью четырех колец. Заместители, расположенные над плоскостью, называют β-*ориентированными* и соответствующую химическую связь изображают *непрерывной* чертой. Заместители, расположенные ниже плоскости колец, находятся в α-*ориентации*, и соответствующая связь изображается *прерывистой* линией.

Атом водорода при атоме С-5 может на-

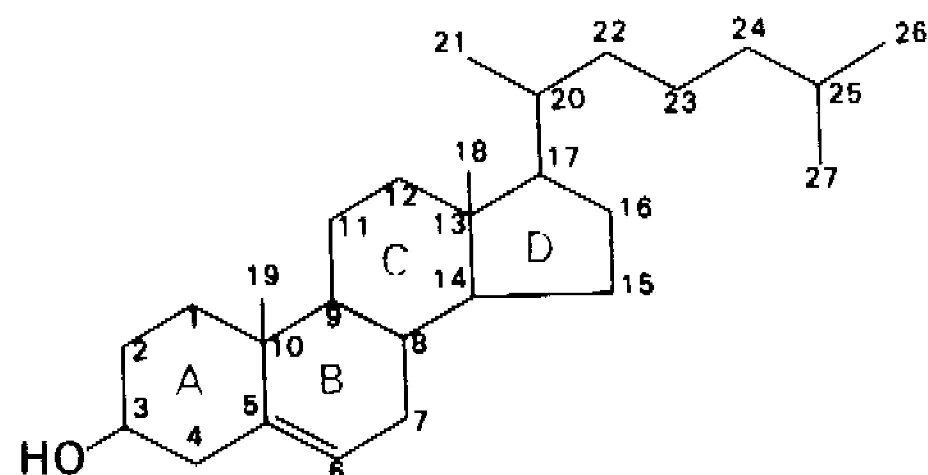
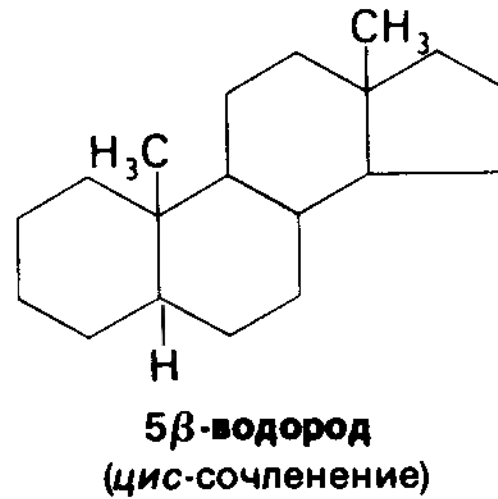


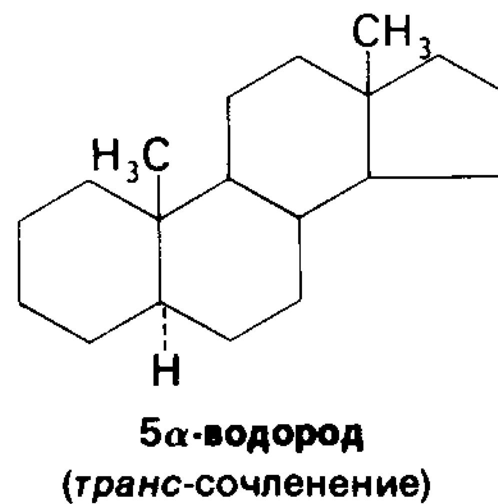
Рис. 20.18. Нумерация атомов углерода в молекуле холестерола.





ходиться в α- или β-ориентации. Если этот атом водорода находится в *α-ориентации*, кольца A и B соединены в *транс*-конформации, тогда как при *β-ориентации* кольца образуют *цис*-сочленение. Если атом водорода при C-5 не обозначен, кольца образуют *транс*-сочленение. Во всех стероидных гормонах, имеющих атом водорода при C-5, он находится в α-ориентации. В молекулах желчных кислот, наоборот, атом водорода при C-5 находится в β-ориентации. Таким образом, *цис-сочленение характерно для солей желчных кислот, тогда как транс-сочленение – для всех стероидных гормонов, у которых при C-5 имеется водород. Транс*-сочленение колец дает почти плоскую структуру, тогда как *цис*-сочленение – изогнутую форму.





20.20. Стероидные гормоны образуются из холестерола

Холестерол – предшественник пяти основных классов стероидных гормонов: прогестагенов глюкокортикоидов, минералокортикоидов, андрогенов и эстрогенов (рис. 20.19). *Прогестерон, один из прогестагенов,* подготавливает выстилающий слой

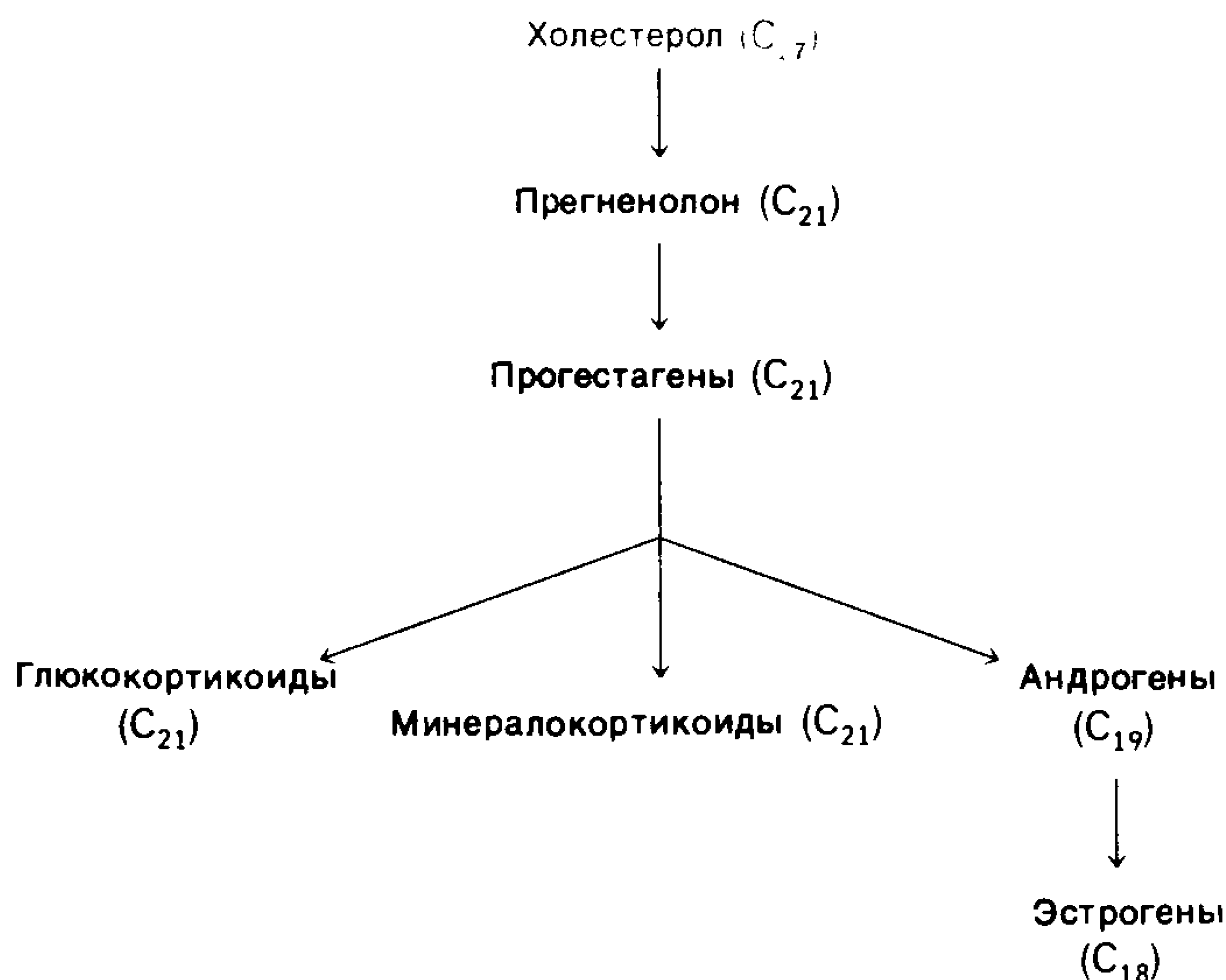
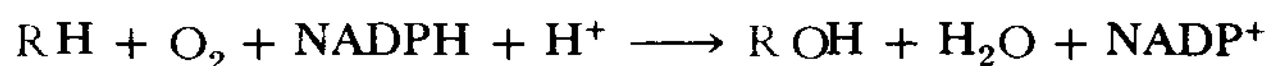


Рис. 20.19. Реакции биосинтеза стероидных гормонов.

матки к имплантации яйца. Кроме того, прогестерон имеет существенное значение для поддержания состояния беременности. *Андрогены* (например, *тестостерон*) отвечают за развитие у самцов вторичных половых признаков, а *эстрогены* (например, *эстрон*) необходимы для развития вторичных половых признаков у самок. Кроме того, эстрогены участвуют в овариальном цикле. *Глюкокортикоиды* (например, *кортизол*) стимулируют глюконеогенез и образование гликогена и способствуют расщеплению жиров и белков. *Минералокортикоиды* (такие, как *альдостерон*) увеличивают обратное всасывание ионов Na^+, Cl^- и HSO_3^- в почках, повышая таким образом объем крови и кровяное давление. Эти классы гормонов синтезируются в основном в следующих местах: прогестагены – в желтом теле; эстрогены – в яичниках; андрогены – в семенниках; глюкокортикоиды и минералокортикоиды – в коре надпочечников.

20.21. Стероиды гидроксилируются под действием монооксигеназ, использующих NADPH и кислород

Реакции гидроксилирования играют очень важную роль в синтезе холестерола из сквалена и в превращении холестерола в стероидные гормоны и желчные кислоты. Все эти реакции гидроксилирования идут при участии *NADPH и* O_2. Как показали опыты с использованием O_2 и H_2O, меченных ^{18}O, атом кислорода включенной гидроксильной группы происходит из O_2, а не из H_2O. Один из атомов кислорода молекулы O_2 включается в субстрат, а второй восстанавливается до воды. Ферменты, катализирующие подобные реакции, называются *монооксигеназами* (или оксигеназами со смешанной функцией). Напомним, что еще одна монооксигеназа участвует также в гидроксилировании фенилаланина (разд. 18.16).



$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

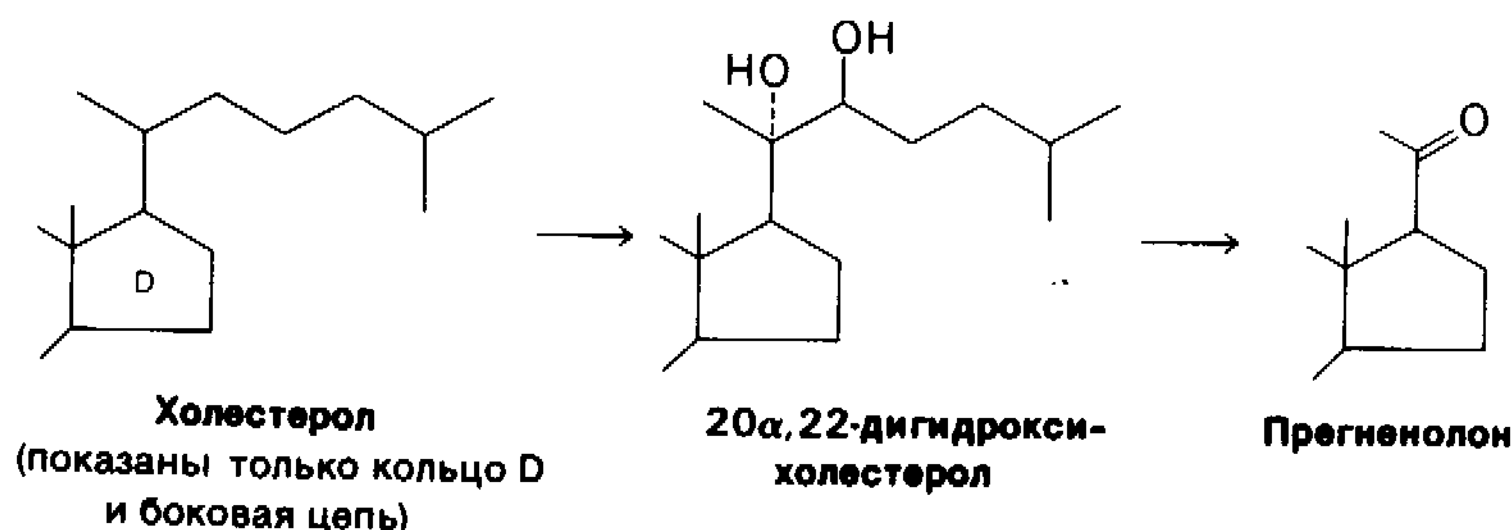
Для реакции гидроксилирования необходимо активировать кислород. При синтезе стероидных гормонов и солей желчных кислот активация осуществляется с помощью особого цитохрома, названного P_{450}, поскольку комплекс этого цитохрома с CO имеет максимум поглощения при 450 нм. Цитохром P_{450} – конечный компонент *цепи переноса электронов*, обнаруженной в митохондриях надпочечников и в микросомах печени. Роль этой цепи состоит прежде всего в гидроксилировании, а не в окислительном фосфорилировании. Электроны NADPH, обладающие высоким энергетическим потенциалом, переносятся на флавопротеин этой цепи; затем они передаются на *адренодоксин*, белок, содержащий негемовое железо. Адренодоксин переносит электроны на окисленную форму цитохрома P_{450}. Затем восстановленная форма P_{450} активирует O_2.

Система, включающая цитохром P_{450}, играет важную роль в *обезвреживании чужеродных (ксенобиотических) соединений*. Например, гидроксилирование барбитурата фенобарбитала *увеличивает его растворимость* и *облегчает его выведение*. Точно так же и полициклические ароматические углеводороды гидроксилируются системой P_{450}. Введение гидроксильных групп позволяет присоединить к этим молекулам весьма полярные группы (например, глюкуронат или сульфат), которые заметно увеличивают растворимость модифицированных ароматических молекул. Однако действие системы P_{450} не всегда полезно для организма. Последние исследования показали, что *наиболее мощные канцерогены превращаются in vivo в химически активную форму*. Этот процесс *метаболической активации* осуществляется обычно системой P_{450}.

20.22. Прегненолон образуется из холестерола путем отщепления боковой цепи

В состав стероидных гормонов входит не более 21 атома углерода, тогда как холестерол содержит 27 атомов. Первая стадия синтеза стероидных гормонов – удаление шестиуглеродного фрагмента боковой цепи холестерола; при этом образуется *прегненолон*. Боковая цепь холестерола гидроксилируется по атомам С-20 и С-22, затем связь между этими атомами расщепляется. Последняя реакция катализируется десмолазой. Все три реакции идут с участием NADPH и O_2.

Адренокортикотропный гормон (АКТГ или кортикотропин) – полипептид, синтезирующийся в передней доле гипофиза. АКТГ стимулирует превращение холестерола в прегненолон – предшественник всех стероидных гормонов.



20.23. Синтез прогестерона и кортикоидов

Прогестерон синтезируется из прегненолона в две стадии. 3-гидроксигруппа прегненолона окисляется в 3-оксогруппу, а Δ^5-двойная связь изомеризуется в Δ^4-двойную связь. *Кортизол*, основной глюкокортикоид, синтезируется из прогестерона путем гидроксилирования атомов С-17, С-21 и С-11; С-17 должен быть гидроксилирован раньше С-21, а реакция гидроксилирования С-11 может происходить на любом этапе. Ферменты, катализирующие эти реакции, весьма специфичны, как показывают некоторые наследственные нарушения метаболизма стероидов. Начальная стадия синтеза *альдостерона*, основного минералокортикоида,– гидроксилирование прогестерона по С-21. Образующийся дезоксикортикостерон гидроксилируется по С-11. Затем боковая метильная группа С-18 окисляется до альдегидной и образуется альдостерон.

20.24. Синтез андрогенов и эстрогенов

Синтез андрогенов (рис. 20.21) начинается с гидроксилирования прогестерона по С-17. Затем боковая цепь, включающая С-20 и С-21, отщепляется, и образуется андроген *андростендион*. Еще один андроген, *тестостерон*, образуется путем восстановления 17-оксогруппы андростендиона. Андрогены

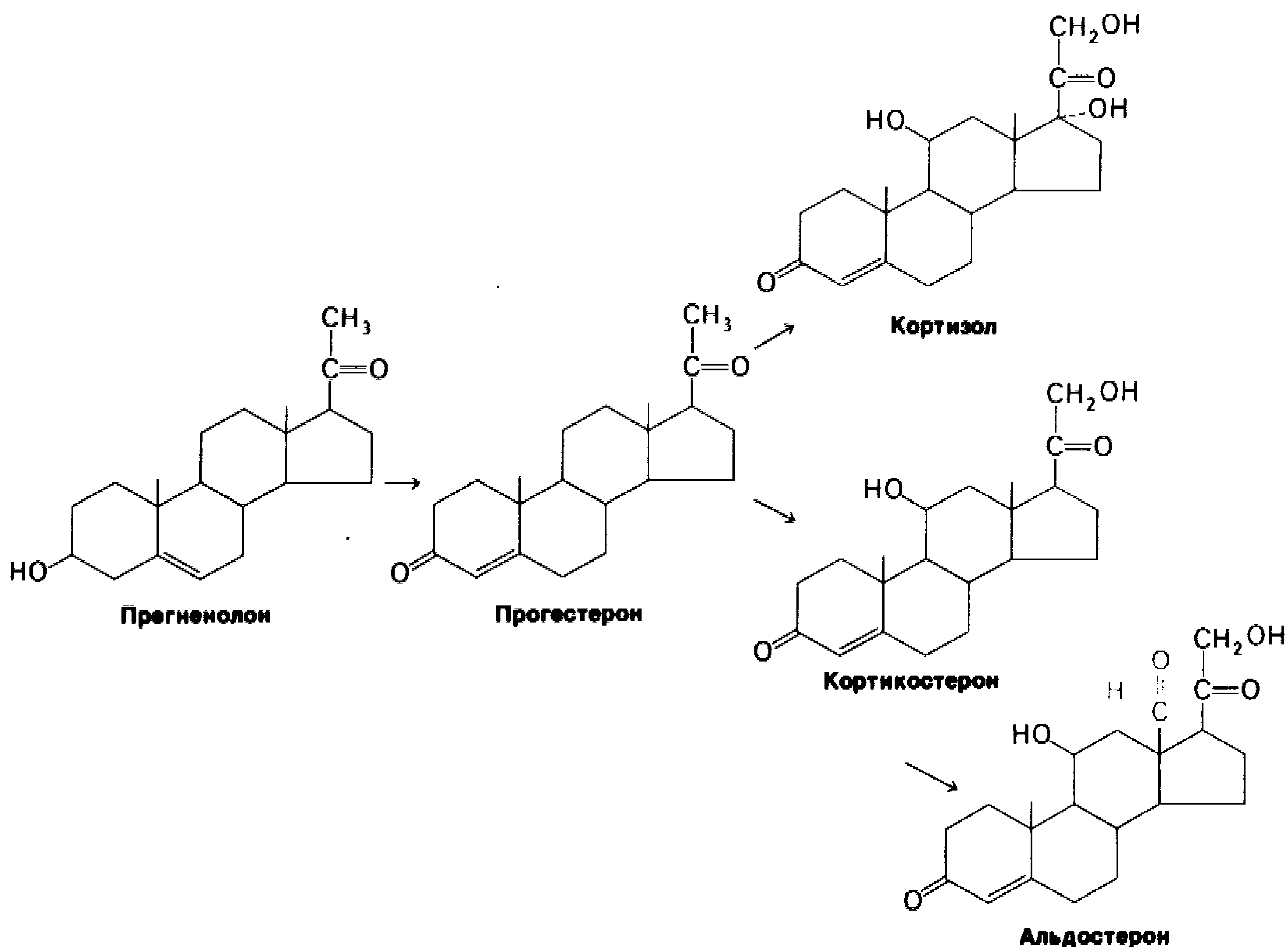


Рис. 20.20. Синтез прогестерона и кортикостероидов.

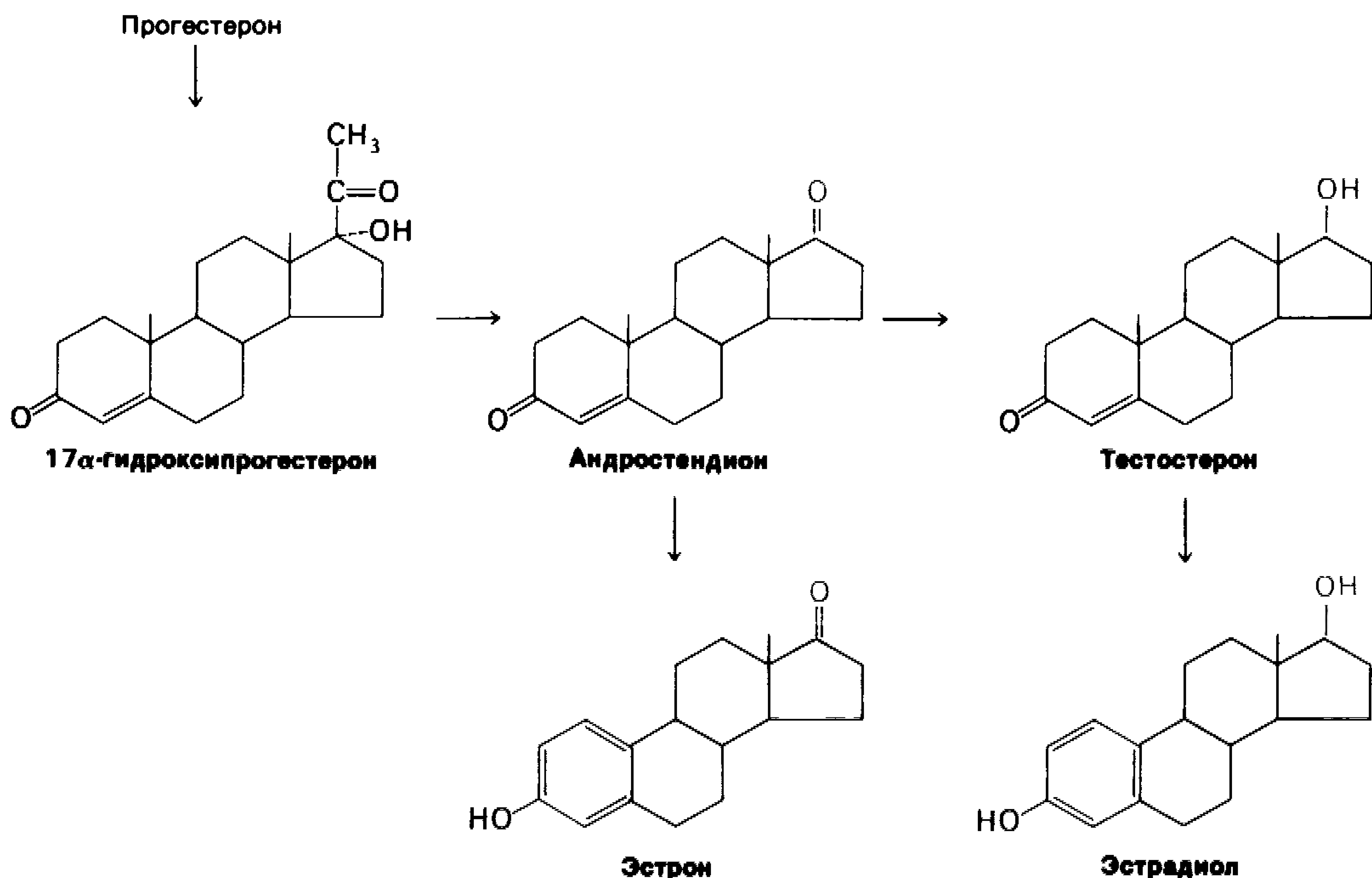


Рис. 20.21. Синтез андрогенов и эстрогенов.

содержат 19 атомов углерода. Эстрогены синтезируются из андрогенов путем удаления боковой метильной группы С-19 и формирования ароматического кольца А. Эти реакции идут с участием NADPH и O_2. Эстроген *эстрон* происходит из андростендиона, тогда как другой эстроген, *эстрадиол*, образуется из тестостерона.

20.25. Недостаточная активность 21-гидроксилазы приводит к вирилизму и увеличению надпочечников

Наиболее распространенное наследственное нарушение синтеза стероидных гормонов — недостаточность *21-гидроксилазы*, фермента, необходимого для синтеза глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Пониженное образование глюкокортикоидов приводит к повышенной секреции АКТГ в передней доле гипофиза. Такая реакция — проявление обычного механизма обратной связи, регулирующего активность коры надпочечников. *Надпочечники увеличиваются из-за высокой концентрации АКТГ в крови, и в результате увеличивается синтез прегненолона.* Вследствие этого увеличиваются концентрации прогестерона и 17 α-гидроксипрогестерона, что в свою очередь *заметно повышает количество андрогенов*, так как они образуются из 17 α-гидроксипрогестерона.

Наиболее явное клиническое проявление недостаточности 21-гидроксилазы — *вирилизм*, вызванный повышением концентрации андрогенов. У больных девочек вирилизм обычно заметен уже при рождении. Андрогены, выделяющиеся в процессе развития плода женского пола, вызывают маскулинизацию наружных половых органов. У мальчиков половые органы при рождении выглядят нормальными. Спустя несколько месяцев признаки преждевременного полового развития становятся очевидными: наблюдается ускоренный рост и чрезмерно раннее созревание костей. В результате взрослые люди с этим нарушением чаще всего имеют низкий рост. Примерно половина больных, у которых наблюдается недостаток 21-гидроксилазы, *постоянно теряют Na^+ с мочой.* У них очень низкая концентрация основного минералокортикоида альдостерона. Потеря соли вызывает обезвоживание и падение давления, что может привести к шоку и внезапной смерти.

Недостаточность *21-гидроксилазы поддается лечению.* Введение какого-либо глюкокортикоида восполняет недостаток необходимого гормона и одновременно подав-

Рахит –

от греческого слова rhachis – хребет.

Остеомаляция –

от греческих слов osteon – кость и malakia – мягкость.

ляет избыточную секрецию АКТГ. В результате прекращается синтез избыточного количества андрогенов. Если больные теряют соли, им можно вводить также минералокортикоиды. Развитие некоторых симптомов недостаточности 21-гидроксилазы можно предотвратить, если начать лечение в первые два года жизни.

Известны и некоторые другие наследственные нарушения синтеза стероидных гормонов. Наблюдается недостаточность ферментов 11-гидроксилазы, 17-гидроксилазы, 3β-дегидрогеназы и десмолазы. Все эти дефекты в ферментативной активности ведут к компенсаторному увеличению надпочечников. Поэтому в клинической практике все нарушения, относящиеся к этой группе, называют *врожденной гиперплазией надпочечников*. Недостаточность 11-гидроксилазы, так же как и 21-гидроксилазы, сопровождается признаками вирилизма.

20.26. Витамин D образуется из холестерола под действием света

Холестерол является также предшественником витамина D, играющего центральную роль в регуляции метаболизма кальция и фосфора. *7-дегидрохолестерол (провитамин D_3) подвергается фотолизу под действием ультрафиолетового света, превращаясь в превитамин D_3, который спонтанно изомеризуется в витамин D_3* (рис. 20.22). Витамин D_3 (холекальциферол) превращается в активный гормон в результате реакции гидроксилирования, происходящей в печени и почках. Недостаточность витамина D в детстве приводит к *рахиту*, для которого характерно недостаточное накопление кальция в хрящах и костях.

Дэниел Уэбстер (Daniel Webster) так описал рахит в 1645 г.:

«... Весь скелет становится гибким, как размягченный воск, так что вялые, расслабленные ноги с трудом выдерживают вес тела; поэтому большие берцовые кости, уступая давлению слишком тяжелого скелета, выгибаются внутрь; по этой же причине ноги в верхней части сближаются друг с другом; спина из-за искривления позвоночника выгибается в горб в обла-



Рис. 20.22. Превращение 7-дегидрохолестерола в витамин D (холекальциферол). Витамин D_2 (эргокальциферол) может образовываться аналогичным путем из растительного стероида эргостерола. Витамин D_2 отличается от витамина D_3 наличием двойной связи С-22—С-23 и метильной группы С-24.

15–31

сти поясницы... При наиболее тяжелых формах болезни больные не могут из-за слабости прямо сидеть, и тем более стоять...»

Рахит был настолько распространен, что Уэбстер назвал его «болезнью английских детей». Теперь мы знаем, что эти дети страдали рахитом потому, что в течение многих месяцев в году получали слишком мало солнечного света. Из-за этого 7-дегидрохолестерол в коже не подвергался фотолизу с образованием превитамина D_3. Кроме того, они получали с пищей мало витамина D, так как большинство природных продуктов содержат мало этого витамина. Исключение составляют жиры печени рыб. Поэтому в течение многих лет жир из печени трески использовали в качестве богатого источника витамина D. В настоящее время основной источник витамина D в пище – обогащенные этим витамином продукты. В США в молоко добавляют 400 МЕ этого витамина на 1 л (10 мкг/л). Рекомендуемая суточная доза витамина D – 400 МЕ независимо от возраста. У взрослых нехватка витамина D вызывает размягчение костей и делает их хрупкими; это состояние называется *остеомаляцией*. Широкая распространенность остеомаляции среди арабских женщин-бедуинок, закутанных так, что только глаза доступны солнечному свету,– наглядное свидетельство того, что витамин D столь же необходим взрослым, как и детям.

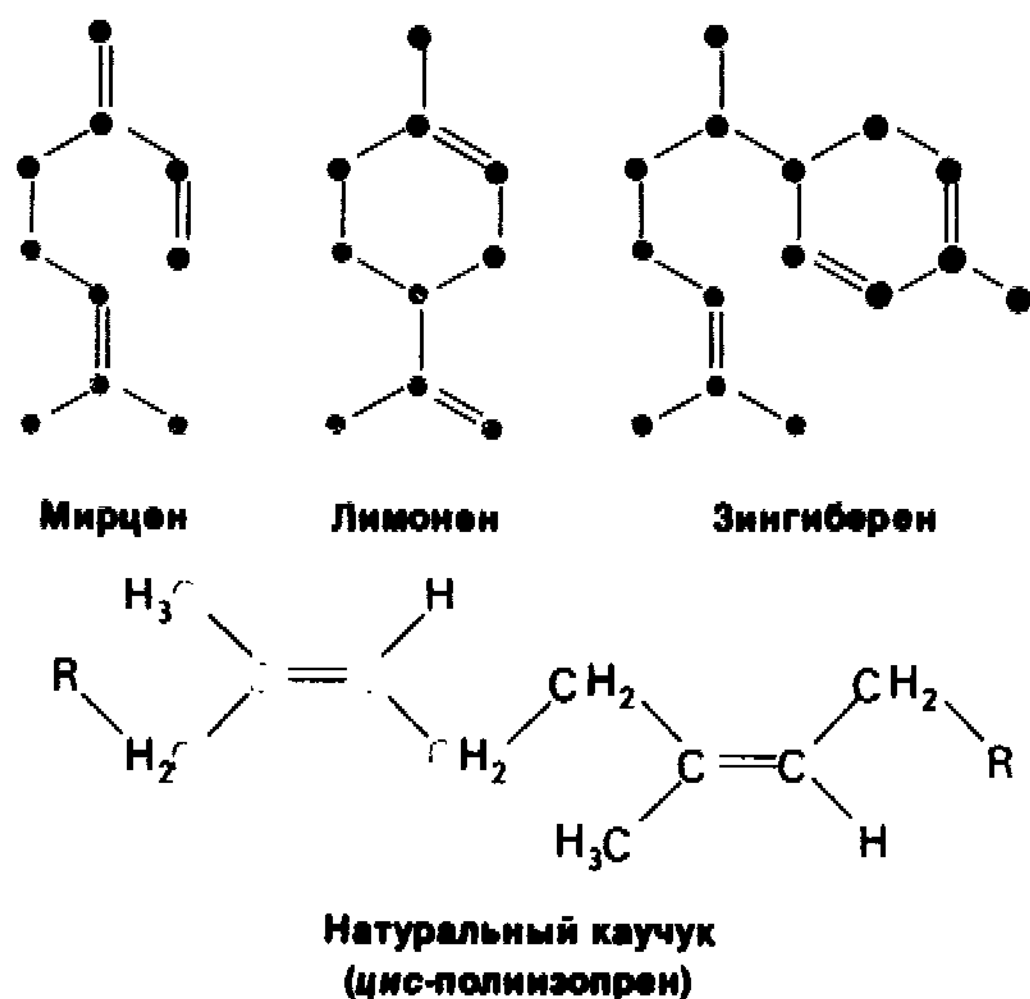


Рис. 20.23. Формулы некоторых изопреноидных соединений. Пятиуглеродные блоки выделены цветом.

20.27. При соединении пятиуглеродных элементов образуются самые разнообразные молекулы

Синтез сквалена (C_{30}) из изопентенилпирофосфата (C_5) – пример, иллюстрирующий общий принцип сборки углеродных скелетов биологических молекул. *Из изопентенилпирофосфата, основного пятиуглеродного строительного блока, образуется множество поразительно разнообразных соединений.* Ароматические соединения многих растений представляют собой летучие 10- и 15-углеродные соединения, называемые *терпенами*. Например, мирцен ($C_{10}H_{16}$) из листьев лавра состоит из двух изопреновых единиц; такую же структуру имеет лимонен ($C_{10}H_{15}$) из лимонного масла. Зингиберен ($C_{15}H_{24}$) из масла имбиря состоит из трех изопреновых единиц. Некоторые терпены, в частности гераниол из герани и ментол из масла перечной мяты, относятся к спиртам, другие, например цитронеллаль,– к альдегидам. *Натуральный каучук* – линейный полимер *цис*-изопреновых единиц.

Мы уже встречались с некоторыми молекулами, содержащими изопреновые боковые цепи. Углеводородная *боковая C_{30}-цепь витамина K_2*, играющего ключевую роль в свертывании крови (разд. 8.23), построена из шести пятиуглеродных единиц. *Кофермент Q_{10}* митохондриальной дыхательной цепи (разд. 14.4) имеет боковую цепь из десяти изопреновых единиц. Еще один пример – *фитольная боковая цепь в молекуле хлорофилла* (разд. 19.2), которая образуется из четырех изопреновых единиц.

Изопреноидные соединения могут радовать глаз своим цветом или иметь приятный запах. Их можно рассматривать как настоящие молекулы ощущений!

Цвет помидоров и моркови обусловлен каротиноидами *ликопином и β-каротином* соответственно. Эти соединения поглощают свет потому, что содержат длинные цепи че-

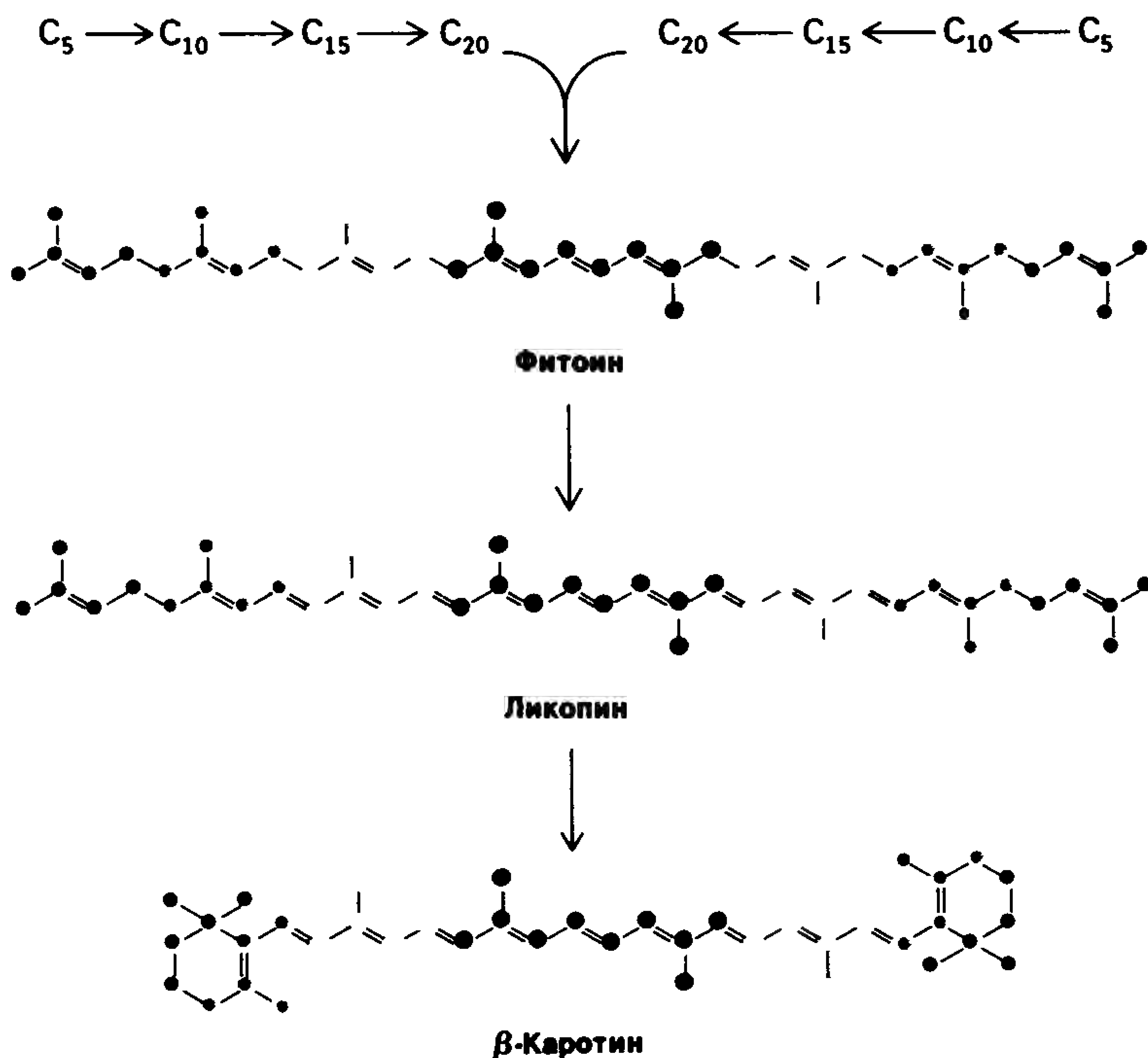
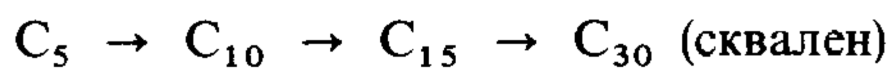
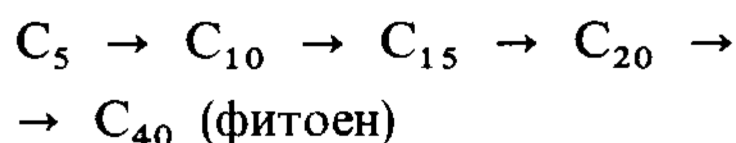


Рис. 20.24. Синтез C_{40}-каротиноидов: фитоина, ликопина и β-каротина.

редующихся одинарных и двойных связей, т. е. относятся к полиенам. Их углеродный скелет C_{40} строится путем последовательного присоединения C_5-единиц с образованием *геранилгеранилпирофосфата, промежуточного C_{20}-продукта.* Затем две такие молекулы конденсируются «хвост к хвосту». Этот путь биосинтеза напоминает синтез сквалена с той лишь разницей, что происходит сборка и конденсация не C_{15}-, а C_{20}-единиц.



$C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15} \rightarrow C_{30}$ (сквален)



$C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15} \rightarrow C_{20} \rightarrow$
$\rightarrow C_{40}$ (фитоен)

При дегидратации C_{40}-продукта конденсации фитоина образуется ликопин. Ликопин превращается в β-каротин путем циклизации концов углеводородной цепи (рис. 20.24). Каротиноиды играют роль светопоглощающих молекул в фотосинтезирующих комплексах, а также каким-то образом защищают клетки прокариот от губительного действия света. Кроме того, каротиноиды необходимы для зрения. β-Каротин-предшественник ретиналя, хромофора всех известных зрительных пигментов (разд. 37.13). *Приведенные примеры иллюстрируют принципиально важную роль изопентенилпирофосфата в сборке больших углеродных скелетов биологических молекул. Они также ясно показывают, что изопреноидные соединения распространены повсеместно в природе и выполняют разнообразные весьма важные функции.*

Заключение

Фосфатидат, промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов (фосфоглицеридов) и триацилглицеролов (триглицеридов), образуется путем ацилирования глицерол-3-фосфата за счет ацил-СоА. Гидролиз его фосфорильной группы и последующее ацилирование дают триацилглицерол. CDP-ацилглицерол, активированный промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов de novo, образуется из фосфатидной кислоты и СТР. Затем активированный фосфатидильный остаток переносится на гидроксильную группу какого-нибудь полярного спирта, например серина; в результате образуется фосфатидилсерин. При декарбоксилировании этого фосфоацилглицерола

образуется фосфатидилэтаноламин, который метилируется S-аденозинметионином и дает фосфатидилхолин. Этот фосфоацилглицерол может быть также синтезирован из готовых остатков с использованием уже имеющегося холина. Активированный промежуточный продукт этого пути – CDP-холин. Сфинголипиды синтезируются из церамида, образующегося путем ацилирования сфингозина. Ганглиозиды – сфинголипиды, содержащие олигосахаридный остаток. В этом олигосахариде содержится хотя бы один остаток N-ацетилнейрамината или другой сходной сиаловой кислоты. Ганглиозиды синтезируются путем ступенчатого присоединения активированных сахаров, например UDP-глюкозы, к церамиду.

Холестерол – стероидный компонент мембран эукариотических клеток и предшественник стероидных гормонов. Он образуется из ацетил-CoA. Решающая стадия в образовании холестерола – синтез мевалоната из 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA (образующегося из ацетил-CoA и ацетоацетил-CoA). Мевалонат превращается в изопентенилпирофосфат (C_5), который конденсируется со своим изомером диметилаллилпирофосфатом (C_5) с образованием геранилпирофосфата (C_{10}). Присоединение второй молекулы изопентенилпирофосфата дает фарнезилпирофосфат (C_{15}). Две молекулы фарнезилпирофосфата конденсируются, образуя сквален (C_{30}). Этот промежуточный продукт циклизуется в ланостерол (C_{30}), который подвергается модификации и превращается в холестерол (C_{27}). Синтез холестерола в печени регулируется изменениями количества и активности 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA — редуктазы, фермента, катализирующего решающий этап его биосинтеза. Рецептор липопротеинов низкой плотности играет основную роль в регуляции проникновения холестерола в большинство клеток вне печени и кишечника.

Из холестерола образуется пять основных классов стероидных гормонов: прогестагены, глюкокортикоиды, минералокортикоиды, андрогены и эстрогены. Важную роль в синтезе стероидных гормонов и желчных кислот из холестерола играют реакции гидроксилирования, катализируемые оксигеназами со смешанной функцией при участии NADPH и O_2. Ключевой промежуточный продукт синтеза стероидных гормонов прегненолон (C_{21}) образуется путем отщепления боковой цепи холестерола. Прогестерон (C_{21}), синтезируемый из прегненолона,– предшественник кортизола и альдостерона. При расщеплении боковой цепи прогестерона образуется один из андрогенов андростендион (C_{19}). Эстрогены (C_{18}) синтезируются из андрогенов путем отщепления метильной группы и образования ароматического кольца А.

Витамин D, играющий важную роль в регуляции метаболизма кальция и фосфора, образуется из производного холестерола под действием света. Помимо холестерола и его производных из основного пятиуглеродного строительного блока изопентенилпирофосфата синтезируется еще поразительное множество других молекул. В качестве примера протяженных цепей, образованных из этого активированного пятиуглеродного элемента, можно привести углеводородные боковые цепи витамина K_2, кофермента Q_{10} и хлорофилла.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Bloch K., 1965. The biological synthesis of cholesterol, Science, **150**, 19–28.

Brown M.S., Goldstein J.L, 1976. Receptor mediated control of cholesterol metabolism, Science, **191**, 150–154.

Книги по метаболизму липидов

Snyder F. (ed.), 1977. Lipid Metabolism in Mammals, vols. 1 and 2, Plenum.

DeLuca H.F. (ed.), 1978. The Fat-Soluble Vitamins, Plenum.

Wakil S. (ed.), 1970, Lipid Metabolism, Academic Press.

Nes W.R., McKean M.L., 1977. Biochemistry of Steroid and Other Isopentanoids, University Park Press.

Ферменты и механизмы реакций

Walsh C., 1979. Enzymatic Reactions Mechanisms, Freeman. (Содержит превосходное обсуждение механизмов реакций биосинтеза холестерола и других соединений, происходящих из изопентенилпирофосфата.)

Hayaishi O. (ed.), 1974. Molecular Mechanisms of Oxygen Activation, Academic Press.

Holick M.F., Clark M.B., 1978. The photobiogenesis and metabolism of vitamin D, Fed. Proc., **37**, 2567–2574.

McMurray W.C., Magee W.L., 1972. Phospholipid metabolism, Ann. Rev. Biochem., **41**, 129–160.

Gatt S., Barenholz Y., 1973. Enzymes of complex lipid metabolism, Ann. Rev. Biochem., **42**, 61–85.

Popják G., Cornforth J.W., 1960. The biosynthesis of cholesterol, Advan. Enzymol., **22**, 281–335.

Bloch K., 1976. On the evolution of a biosunthetic pathway. In: Kornberg A., Horecker B. L., Cornudella L. and Oro J. (eds.), Reflections on Biochemistry, pp. 143–150, Pergamon. (Проблемное обсуждение эволюции холестерола и других стероидов.)

Липопротеины

Scanu A. M., 1977. Plasma lipoprotein structure, Nature, 270, 209–210.

Smith L. C., Pownall H. J., Gotto A. M., Jr., 1978. The plasma lipoproteins: structure and metabolism, Ann. Rev. Biochem., **47**, 751–777.

Регуляция

Brown M. S., Goldstein J. L., 1974. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity, Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 788–792.

Anderson R. G. W., Goldstein J. L., Brown M. S., 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts, Nature, **270**, 695–699.

Goldstein J. L., Brown M. S., 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis, Ann. Rev. Biochem., **46**, 897–930.

Dempsey M. E., 1974. Regulation of steroid biosynthesis, Ann. Rev. Biochem., **43**, 967–990.

Наследственные заболевания

Stanbury J. B., Wyngaareden J. B., Fredrickson D. S. (eds.), 1978. The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), McGraw-Hill. (Содержит превосходные статьи по наследственным нарушениям метаболизма сфинголипидов, липопротеинов, холестерола и стероидов.)

Dietschy J. M., Gotto A. M., Jr., Ontko J. A. (eds.), 1978. Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism, American Physiological Society.

Вопросы и задачи

1. Напишите сбалансированное уравнение синтеза триацилглицерола из глицерола и жирных кислот.

2. Напишите сбалансированное уравнение синтеза фосфатидилсерина de novo из серина, глицерола и жирнвых кислот.

3. Укажите, какова активированная форма предшественника в следующих реакциях биосинтеза:

а) фосфатидилсерина из серина;

б) фосфатидилэтаноламина из этаноламина;

в) церамида из сфингозина;

г) сфингомиелина из церамида;

д) цереброзида из церамида;

е) ганглиозида G_{M_1} из ганглиозида G_{M_2};

ж) фарнезилпирофосфата из геранилпирофосфата.

4. Как распределяется изотопная метка в молекуле холестерола, синтезированного из следующих предшественников:

а) мевалоната, меченного ^{14}C по углеродному атому карбоксильной группы?

б) малонил-СоА, меченного ^{14}C по углеродному атому карбоксильной группы?

ГЛАВА 21

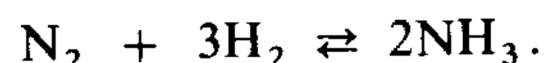
Биосинтез аминокислот и гема

В этой главе рассматривается биосинтез аминокислот и некоторых молекул, которые из них образуются. Прежде всего мы рассмотрим реакции, приводящие к включению азота в состав аминокислот. Этот путь начинается с восстановления N_2 до NH_4^+ в клетках азотфиксирующих микроорганизмов. Затем NH_4 включается в аминокислоты через глутамат и глутамин, два ключевых соединения азотистого метаболизма. Десять из основного набора двадцати аминокислот синтезируются из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот и других метаболических последовательностей с помощью несложных реакций. Мы рассмотрим эти биосинтетические пути и опишем биосинтез ароматических аминокислот и гистидина в качестве примеров аминокислот, синтезирующихся более сложным образом. На самом деле человек должен получать эти десять аминокислот с пищей, потому их и называют незаменимыми аминокислотами. В этих реакциях участвуют два весьма любопытных посредника: тетрагидрофолят, многоцелевой переносчик одноуглеродных единиц трех степеней окисления, и S-аденозилметионин, главный донор метильных групп. Еще одна важная сфера наших интересов – регуляция метаболизма аминокислот. На примере глутамин-синтетазы мы проиллюстрируем некоторые общие принципы регуляции. Конец настоящей главы посвящен синтезу и распаду гема.

21.1. Микроорганизмы используют ATP и сильный восстановитель для превращения N_2 в NH_4

Атомы азота аминокислот, пуринов, пиримидинов и других биологических молекул происходят из NH_4^+. Высшие организмы неспособны включать N_2 в органические соединения. Это превращение – *азотфиксация* – осуществляется только бактериями и сине-зелеными водорослями (цианобактериями). Некоторые из этих микроорганизмов, а именно бактерии *Rhizobium*, заражают корни бобовых растений и образуют корневые клубеньки, в которых и происходит азотфиксация (рис. 21.2). Взаимоотношения между бактериями и растением носят характер симбиоза. Считается, что микроорганизмы переводят в органическую форму примерно $2 \cdot 10^{11}$ кг N_2 в год.

Энергия связи $N{\equiv}N$ составляет 225 ккал/моль. Эта связь весьма устойчива к химическим воздействиям. Ведь Лавуазье назвал этот элемент из-за его инертности «азот», что означает «безжизненный». Промышленный процесс азотфиксации был разработан Фрицем Габером (Fritz Haber) в 1910 г. и используется в настоящее время при производстве удобрений:



$$N_2 + 3H_2 \rightleftarrows 2NH_3.$$

Эту реакцию обычно проводят в присутствии железа в качестве катализатора при температуре около 500°C и давлении 300 атм. Неудивительно поэтому, что биологический процесс азотфиксации осуществляется сложным ферментом. *Нитрогеназный комплекс*, катализирующий эту реакцию, состоит из белковых компонентов двух типов: *редуктазы*, которая поставляет электроны с высокой восстановительной способностью, и собственно *нитрогеназы*, которая использует эти электроны для восстановления N_2 до NH_4^+ (рис. 21.3). Оба компонента представляют собой *железосеропротеины* (Fe-S-белки), в которых железо

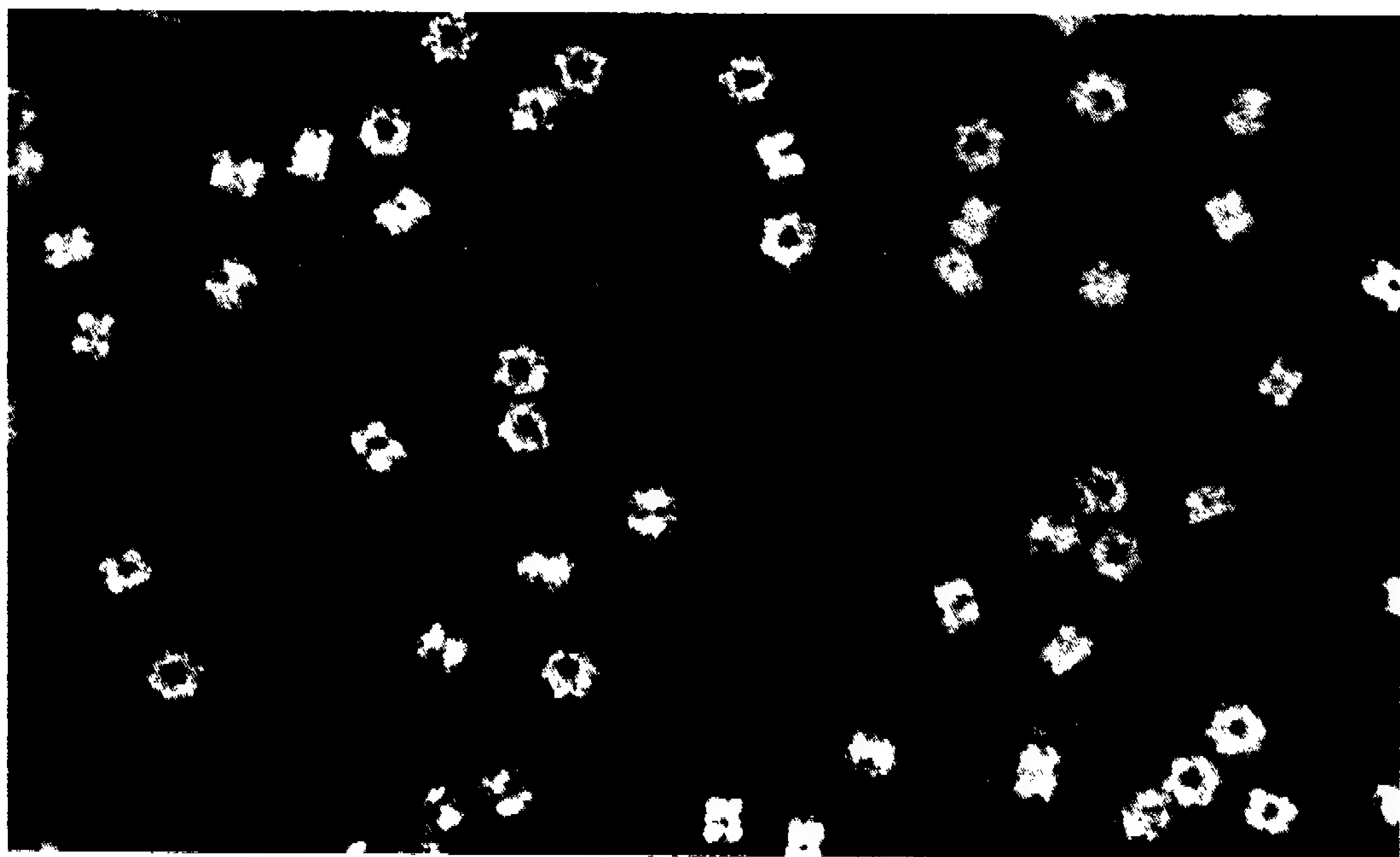
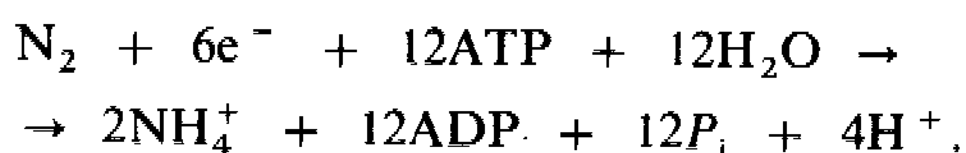


Рис. 21.1 Электронная микрофотография глутамин-синтетазы *E. coli*. Этот фермент играет ключевую роль в метаболизме азота. (Печатается с любезного разрешения д-ра Earl Stadtman.)

связано с атомом серы остатка цистеина и с неорганическим сульфидом (разд. 14.4). Нитрогеназный компонент комплекса содержит, кроме того, один или два атома *молибдена*, поэтому раньше его называли *Mo-Fe-белком*. Его субъединичная структура $\alpha_2\beta_2$, а мол. масса $\sim$ 200 кДа. Редуктазный компонент – (называемый также *Fe-белком*) состоит из двух идентичных полипептидов. Его мол. масса $\sim$ 65 кДа. В нитрогеназном комплексе один или два Fe-белков связаны с Mo-Fe-белком.

Для превращения N_2 в NH_4^+ под действием нитрогеназного комплекса *необходимы ATP и мощный восстановитель*. У большинства азотфиксирующих микроорганизмов источником электронов с высоким потенциалом для этой *шестиэлектронной реакции* служит *восстановленный ферредоксин*, переносчик электронов, который мы уже рассматривали при обсуждении фотосинтеза (разд. 19.9). Регенерирует ли затем восстановленный ферредоксин путем фотосинтеза или в результате окислительных процессов, зависит от организма. Реакции, катализируемые нитрогеназным комплексом, имеют следующую стехиометрию:



$$N_2 + 6e^- + 12ATP + 12H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow 2NH_4^+ + 12ADP + 12P_i + 4H^+.$$

Проведенные недавно исследования нитрогеназы свидетельствуют о следующей последовательности реакций. Сначала восстановленный ферредоксин отдает электроны редуктазному компоненту комплекса. На втором этапе ATP связывается с редуктазой и сдвигает ее окислительно-восстановительный потенциал с – 0,29 до – 0,40 В путем изменения ее конформации. Это увеличение восстановительной способности редуктазы позволяет ей переносить электроны на нитрогеназный компонент. На третьей стадии происходит перенос электронов, гидролизуется ATP и редуктаза отделяется от нитрогеназного компонента. Наконец, N_2 связывается с нитрогеназным компонентом комплекса и восстанавливается до NH_4.

Поскольку источники энергии для химического производства аммиака по методу Габера истощаются и становятся все дороже, специалисты проявляют всевозрастающий интерес к увеличению азотфиксации микроорганизмами. Один из возможных

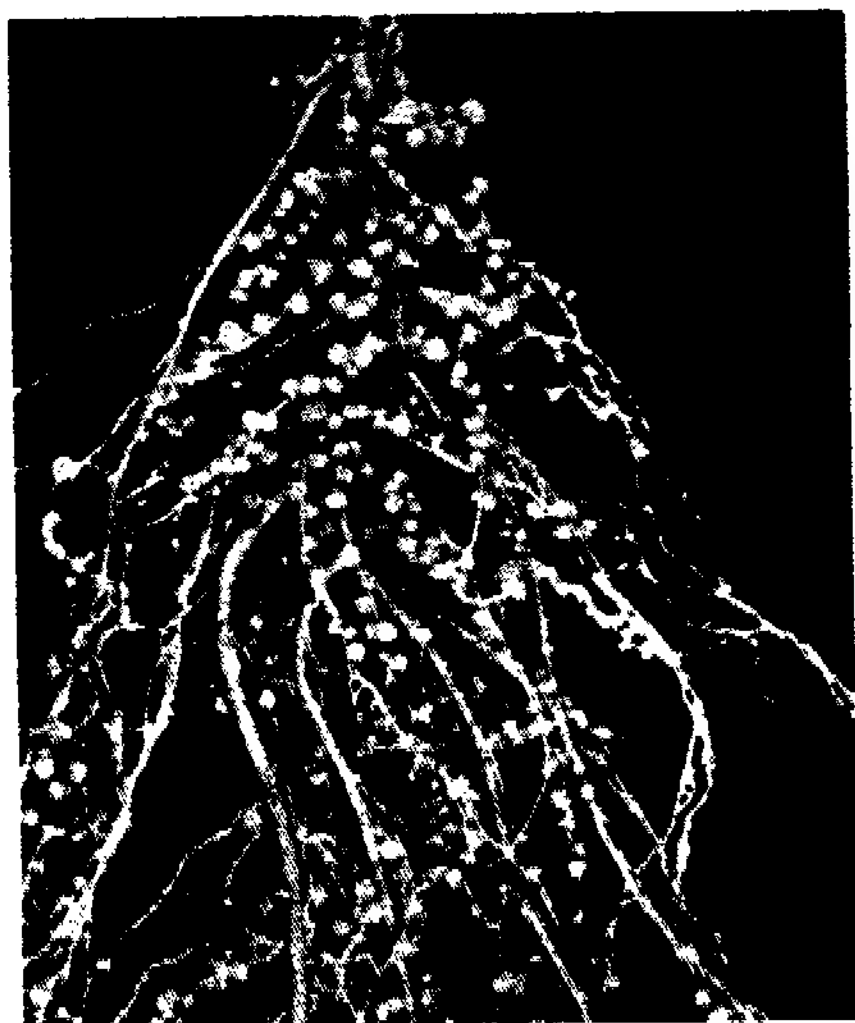
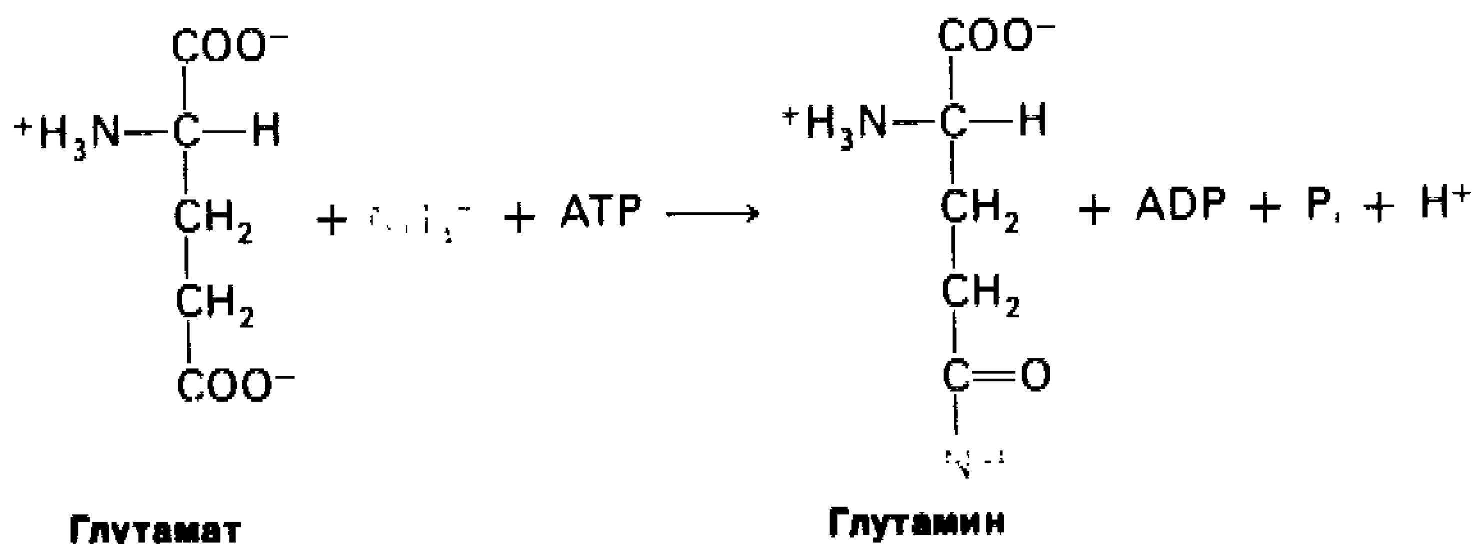


Рис. 21.2. Клубеньки на корневой системе сои – место, где происходит азотфиксация бактериями *Rhizobium*. (Фотография предоставлена Joe C. Burton, Nitrogen Company, Inc.)

подходов состоит в том, чтобы гены, необходимые для азотфиксации, ввести в растения, не относящиеся к бобовым, например

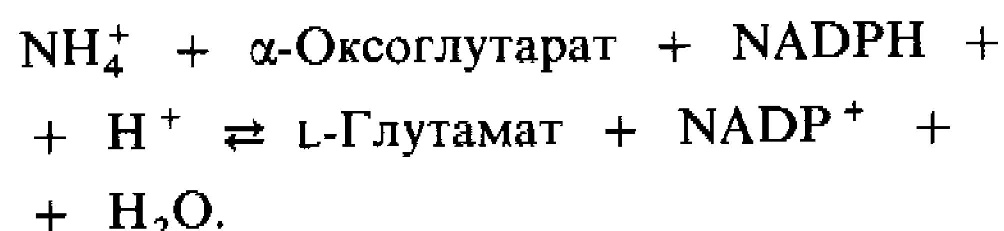


в злаки. Трудность, которую предстоит преодолеть, состоит в исключительной чувствительности нитрогеназного комплекса к инактивации в присутствии кислорода. Бобовые растения поддерживают чрезвычайно низкую концентрацию O_2 в корневых клубеньках путем связывания O_2 с *леггемоглобином*. Еще одна проблема на пути создания новых азотфиксирующих видов – необходимость необычайно быстрого образования ATP. Ведь азотфиксирующие бактерии в корнях бобовых растений потребляют примерно пятую часть всего ATP, который образуется в растении. Существует и другой подход – увеличение скорости азотфиксации в клетках сине-зеленых водорослей, которые образуют собственный ATP путем фотосинтеза и поэтому не зависят от энергетических реакций симбиотического партнера.

21.2. NH_4^+ включается в аминокислоты через глутамат и глутамин

Следующий этап введения азота в биологические молекулы – включение NH_4^+ в аминокислоты. *Глутамат* и *глутамин* играют в этом процессе ключевую роль. α-Аминогруппа большинства аминокислот переносится от α-аминогруппы глутамата в результате реакции трансаминирования. Еще один важный донор азота, глутамин, отдает азот своей боковой цепи при биосинтезе ряда важных соединений.

Глутамат синтезируется из NH_4^+ и α-оксоглутарата, промежуточного продукта цикла трикарбоновых кислот, под действием *глутамат-дегидрогеназы*. Мы уже встречались с этим ферментом в разделе, посвященном распаду аминокислот (разд. 18.1). Когда реакция идет в направлении биосинтеза, используется NADPH в качестве восстановителя; когда же реакция является катаболической, в ней участвует NAD^+ в качестве окислителя:

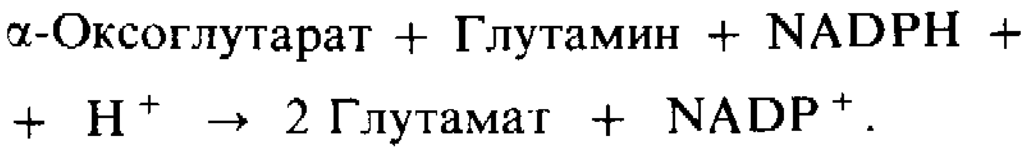


NH_4^+ + α-Оксоглутарат + NADPH +
+ H^+ ⇄ L-Глутамат + $NADP^+$ +
+ H_2O.

Ион аммония вводится в глутамин под действием *глутамин-синтетазы*. Эта реакция амидирования сопряжена с гидролизом ATP. Регуляция глутамин-синтетазы играет важнейшую роль в регуляции всего азотистого обмена. Мы обсудим этот вопрос несколько позже.

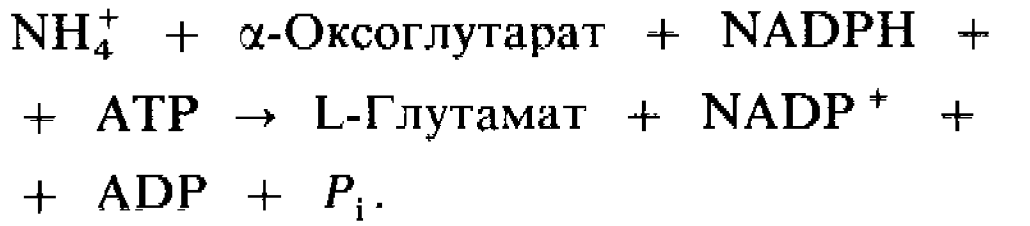
Глутамат-дегидрогеназа и глутамин-синтетаза присутствуют во всех организмах. У большинства прокариот имеется, кроме

того, *глутамат-синтаза*, катализирующая восстановительное аминирование α-оксоглутарата. Донор азота в этой реакции — глутамин; в результате реакции образуются две молекулы глутамата:



$$\alpha\text{-Оксоглутарат} + \text{Глутамин} + NADPH + H^+ \rightarrow 2\,\text{Глутамат} + NADP^+.$$

Если фактором, ограничивающим скорость реакции, является содержание в клетке NH_4^+, то бо́льшая часть глутамата образуется путем последовательных реакций, катализируемых глутамин-синтетазой и глутамат-синтазой. Суммарная реакция описывается следующим уравнением:



$$NH_4^+ + \alpha\text{-Оксоглутарат} + NADPH + ATP \rightarrow \text{L-Глутамат} + NADP^+ + ADP + P_i.$$

Обратите внимание, что стехиометрия этой реакции отличается от реакции, катализируемой глутамат-дегидрогеназой: здесь гидролизуется ATP. Почему этот более дорогой путь иногда используется *E.coli*? Ответ заключается в том, что K_M глутамат-дегидрогеназы для NH_4^+ высока (~ 1 мМ), поэтому фермент не насыщается субстратом при недостаточной концентрации NH_4^+. Глутамин-синтетаза имеет, наоборот, чрезвычайно высокое сродство к NH_4^+.

21.3. Аминокислоты синтезируются из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот и других важных метаболитов

До сих пор мы рассматривали превращение N_2 в NH_4^+ и включение NH_4^+ в состав глутамата и глутамина. Теперь обратимся к биосинтезу других аминокислот. Бактерии, например *E.coli*, могут синтезировать все двадцать аминокислот, входящие в основной набор, тогда как в организме человека образуется лишь половина из них. Аминокислоты, которые должны попадать в организм с пищей, называются *незаменимыми*, а остальные — *заменимыми* (табл. 21.1). *Эти названия отражают потребность организма при определенных условиях.* Например, в цикле мочевины синтезируется достаточно аргинина, чтобы удовлетворить потребности организма взрослого, но не растущего ребенка. Недостаточное содержание хотя бы одной аминокислоты приводит к *отрицательному азотистому балансу.* При этом в организме больше белка разрушается, чем синтезируется, и потому больше азота выводится, чем усваивается.

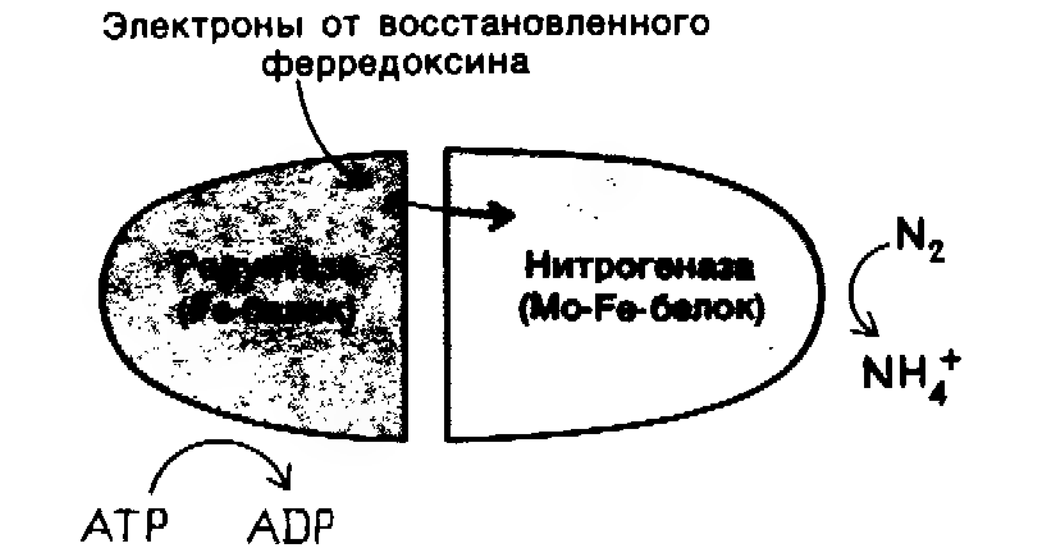


Рис. 21.3. Схематическое изображение нитрогеназного комплекса. Перед тем как N_2 превращается в NH_4, комплекс диссоциирует и редуктаза отделяется от нитрогеназного компонента.

Пути биосинтеза аминокислот разнообразны. Однако они обладают одним важным общим свойством: *углеродный скелет аминокислот происходит из промежуточных продуктов гликолиза, пентозофосфатного пути или цикла трикарбоновых кислот.* Кроме того, ситуация упрощается тем, что аминокислоты подразделяются всего лишь на *шесть биосинтетических семейств* (рис. 21.4).

Заменимые аминокислоты синтезируются с помощью весьма простых реакций, тогда как пути биосинтеза незаменимых аминокислот очень сложны. Например, заменимые аминокислоты *аланин* и *аспартат* синтезируются в одну стадию из пирувата и оксалоацетата соответственно. Обе аминокислоты получают свою аминогруппу от

Таблица 21.1. **Двадцать аминокислот основного набора**

Заменимые	Незаменимые	Заменимые	Незаменимые
Аланин	Аргинин	Глутамин	Лизин
Аспарагин	Валин	Пролин	Метионин
Аспартат	Гистидин	Серин	Треонин
Глицин	Изолейцин	Тирозин	Триптофан
Глутамат	Лейцин	Цистеин	Фенилаланин

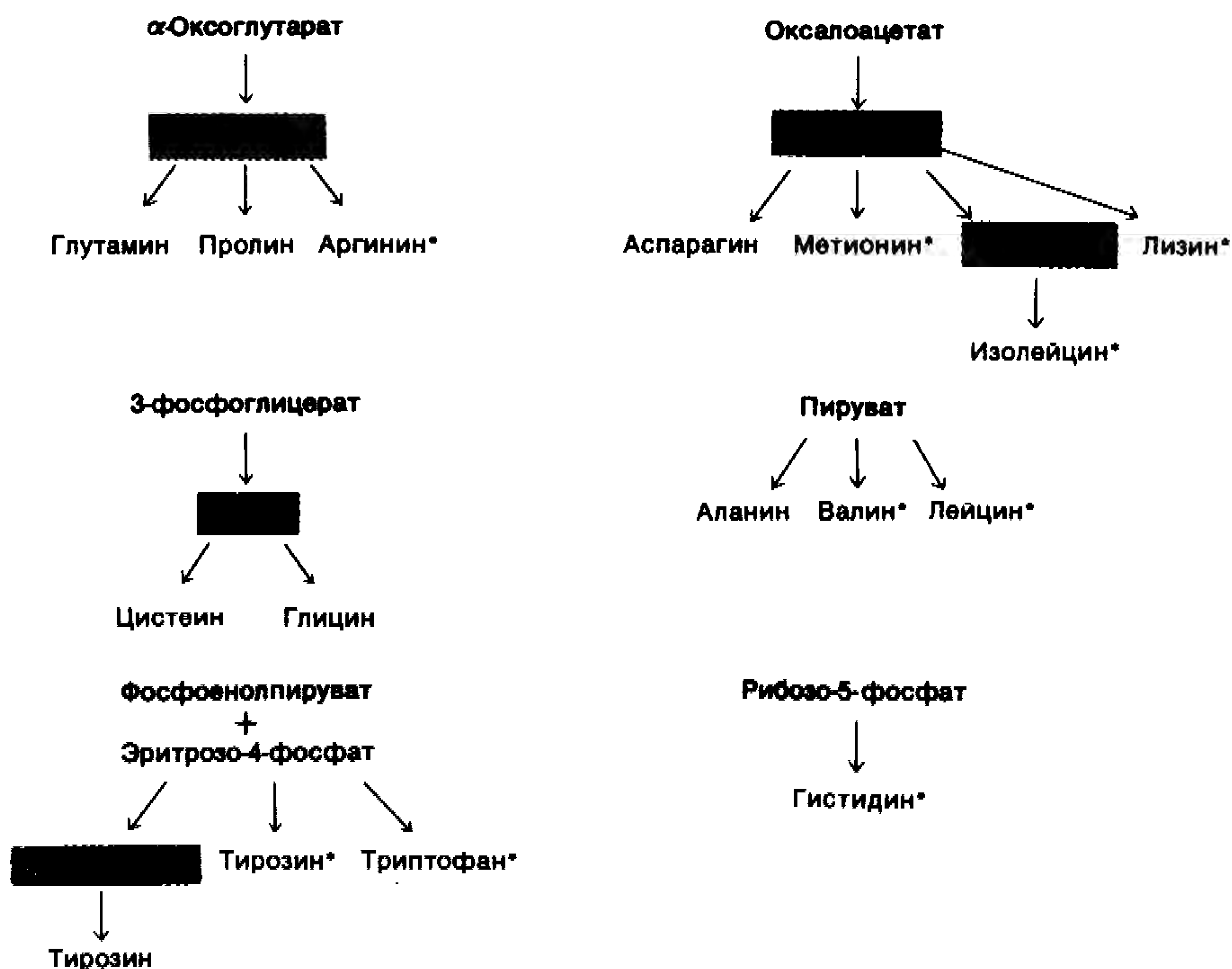
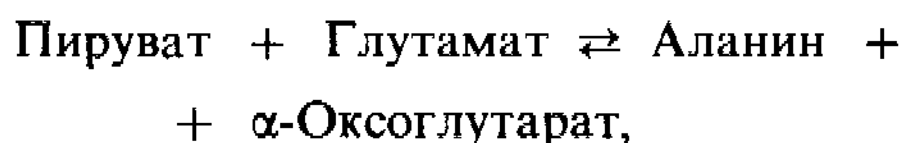
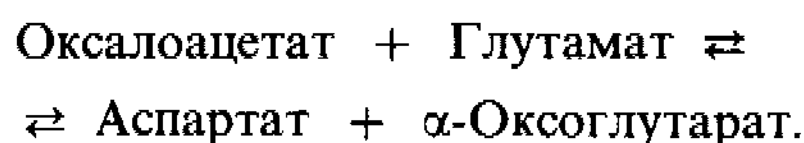


Рис. 21.4. Биосинтетические семейства аминокислот. Основные метаболические предшественники показаны голубым. Аминокислоты, из которых образуются другие аминокислоты, показаны красным. Незаменимые аминокислоты отмечены звездочками.

глутамата в реакции трансаминирования с пиридоксальфосфатом в качестве кофактора (разд. 18.2):

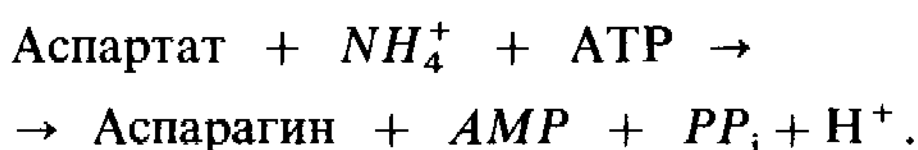


Пируват + Глутамат ⇄ Аланин + α-Оксоглутарат,



Оксалоацетат + Глутамат ⇄ Аспартат + α-Оксоглутарат.

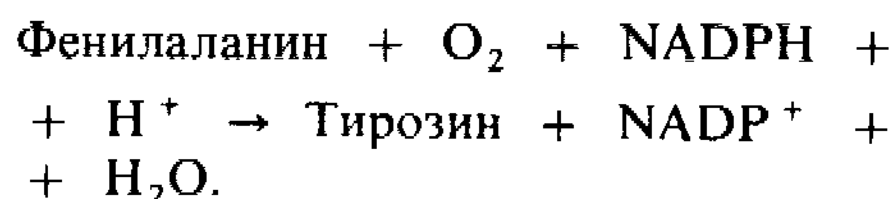
После этого *аспарагин* может быть синтезирован путем амидирования аспартата:



Аспартат + NH_4^+ + ATP → Аспарагин + *AMP* + $PP_i + H^+$.

У млекопитающих донором азота при синтезе аспарагина является глутамин, а не NH_4^+.

Еще один одностадийный синтез заменимой аминокислоты – гидроксилирование фенилаланина (незаменимой аминокислоты) с образованием *тирозина*. Данная реакция происходит в организме млекопитающих:

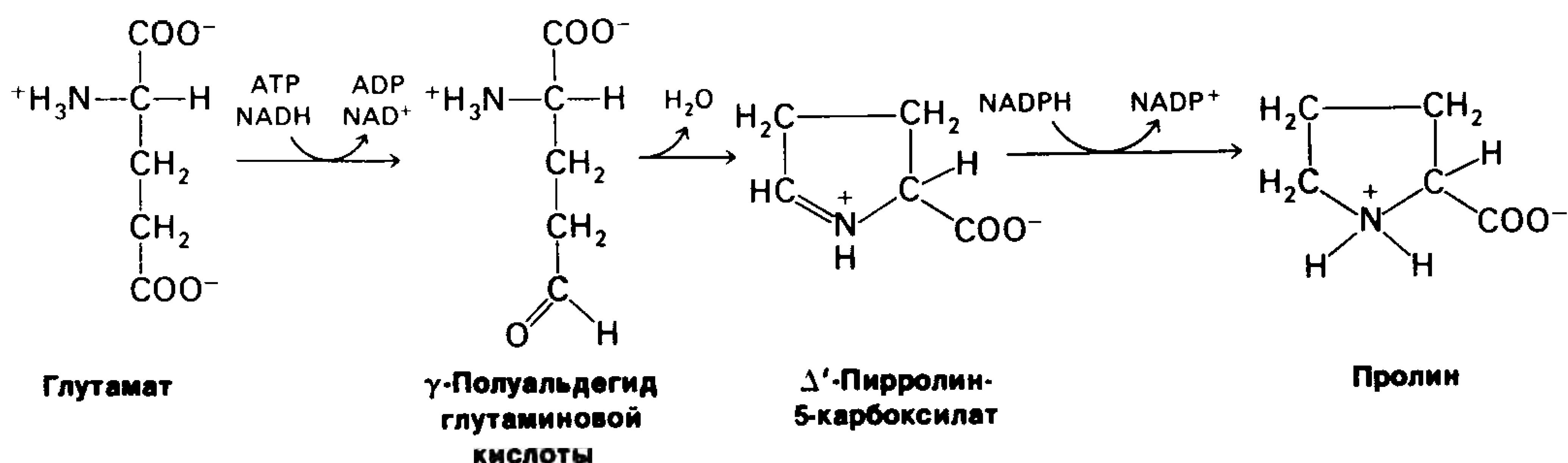


Фенилаланин + O_2 + NADPH + H^+ → Тирозин + $NADP^+$ + H_2O.

Эта реакция катализируется фенилаланингидроксилазой, монооксигеназой, которая рассматривалась выше (разд. 18.16). Следует отметить, что для животных, не имеющих этого фермента, тирозин является незаменимой аминокислотой.

21.4. Глутамат – предшественник глутамина и пролина

Синтез глутамата путем восстановительного аминирования α-оксоглутарата уже обсуждался (разд. 21.2), равно как и превращение глутамата в глутамин (разд. 21.2). Глутамат – предшественник еще одной заменимой аминокислоты, пролина. Сначала γ-карбоксильная группа глутамата реагирует с ATP, образуя ацилфосфат. Этот смешанный ангидрид восстанавливается до альдегида. γ-Полуальдегид глутамата циклизуется с отщеплением H_2O и образует

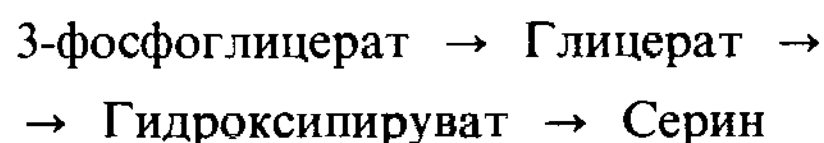


Δ'-пирролин-5-карбоксилат, который восстанавливается NADPH с образованием пролина.

21.5. Серин синтезируется из 3-фосфоглицерата

Серин синтезируется из 3-фосфоглицерата, промежуточного продукта гликолиза. Первая стадия – окисление 3-фосфогидроксипирувата. Эта α-оксокислота подвергается трансаминированию с образованием 3-фосфосерина, который затем гидролизуется с образованием серина.

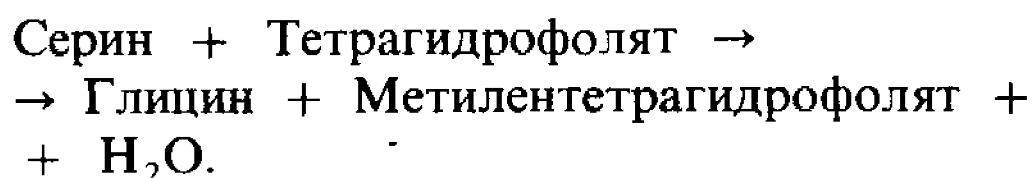
В другом случае гидролиз фосфатной группы может предшествовать окислению и трансаминированию:



3-фосфоглицерат → Глицерат →

→ Гидроксипируват → Серин

Серин – предшественник *глицина* и *цистеина*. При образовании глицина β-углеродный атом боковой цепи серина переносится на *тетрагидрофолят*, переносчик одноуглеродных фрагментов, который мы рассмотрим ниже:



Серин + Тетрагидрофолят →

→ Глицин + Метилентетрагидрофолят +

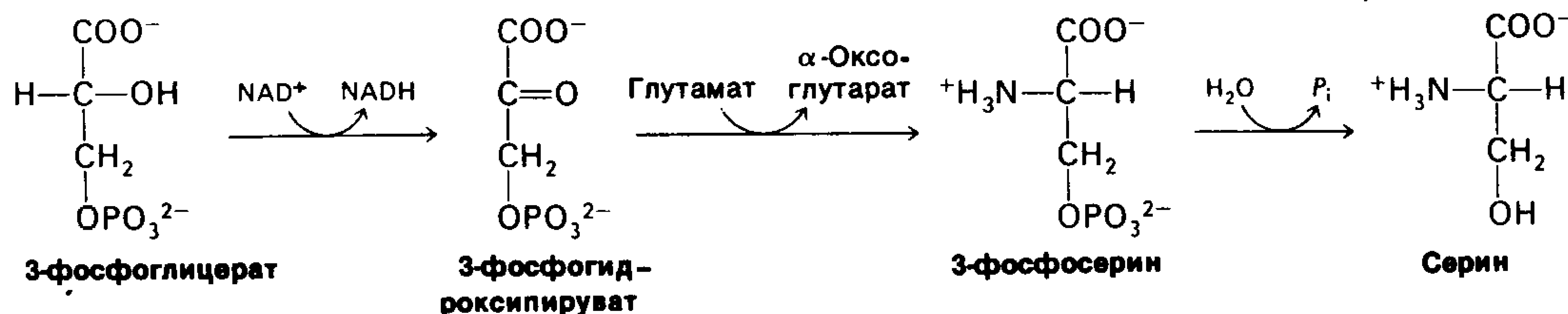
+ H_2O.

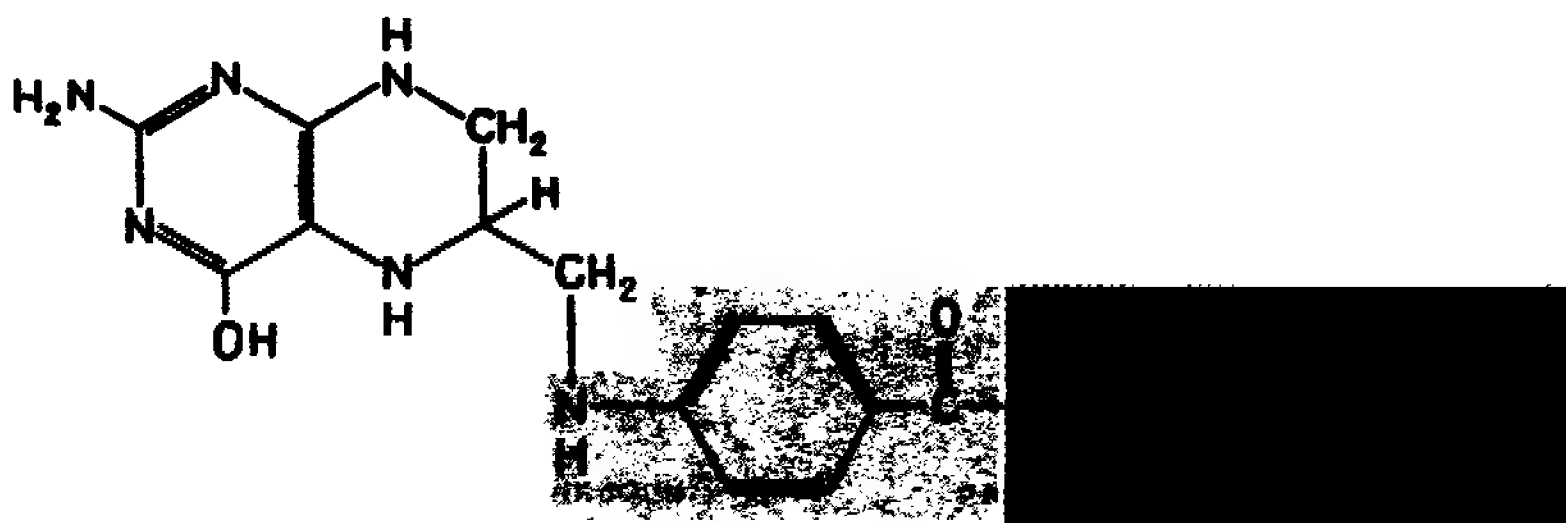
Это превращение катализируется *серин-гидроксиметилтрансферазой*-ферментом, роль простетической группы которого выполняет пиридоксальфосфат. Связь между α- и β-углеродными атомами серина лабилизуется из-за образования шиффова основания между серином и пиридоксальфосфатом. Затем β-углеродный атом серина переносится на тетрагидрофолят. Глицин также может образовываться из CO_2, NH_4^+ и метилентетрагидрофолята в результате реакции, катализируемой *глицин-синтазой*. Для превращения серина в цистеин должно произойти замещение атома кислорода боковой цепи на атом серы, происходящий из метионина. Соответствующую последовательность реакций мы рассмотрим после обсуждения метаболизма одноуглеродных фрагментов.

21.6. Тетрагидрофолят переносит активированные одноуглеродные фрагменты с различной степенью окисления

Тетрагидрофолят (его называют также тетрагидроптероилглутамат) – многоцелевой переносчик одноуглеродных фрагментов. Молекула тетрагидрофолята состоит из трех структурных единиц: замещенного птеридина, *п*-аминобензоата и глутамата. Млекопитающие неспособны синтезировать кольца птеридина. Они получают птеридин с пищей или от микроорганизмов кишечной флоры.

Одноуглеродный фрагмент, переносимый тетрагидрофолятом, связывается с атомом

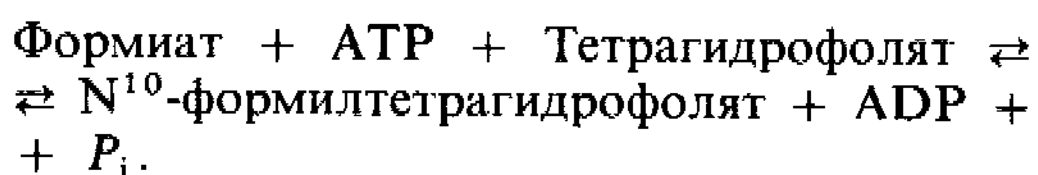




Тетрагидрофолят

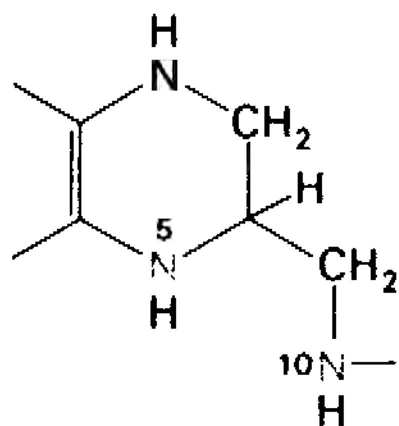
азота N-5 или N-10 (они обозначаются N^5 и N^{10}) или с обоими. Этот фрагмент может иметь три степени окисления (табл. 21.2). Наиболее восстановленная форма – *метильная* группа, промежуточная – *метиленовая* группа. Наиболее окисленные формы – *метенильная, формильная* или *формимино*-группа. Одноуглеродный фрагмент с максимально возможной степенью окисления, CO_2, переносится не тетрагидрофолятом, а биотином (разд. 15.15).

Эти одноуглеродные фрагменты способны к взаимопревращениям (рис. 21.5). N^5, N^{10}-*метилен*тетрагидрофолят может быть восстановлен до N^5-*метил*тетрагидрофолята или окислен до N^5-*метенил*тетрагидрофолята. N^5, N^{10}-*метенил*тетрагидрофолят может превратиться в N^5-*формимино*тетрагидрофолят и N^{10}-*формил*тетрагидрофолят, в которых углерод находится в одной и той же степени окисления. N^{10}-*формил*тетрагидрофолят может быть также синтезирован из формиата и ATP:



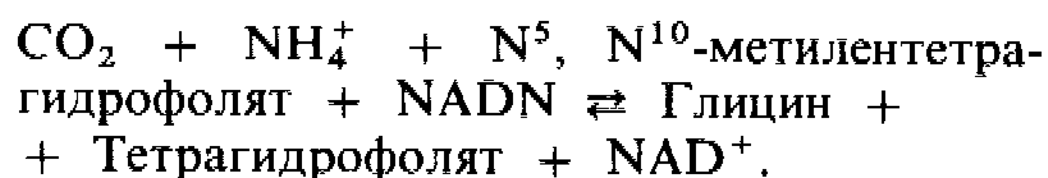
Формиат + ATP + Тетрагидрофолят ⇄ ⇄ N^{10}-формилтетрагидрофолят + ADP + + P_i.

Эти производные тетрагидрофолята служат донорами одноуглеродных фрагментов



Реакционноспособная часть молекулы тетрагидрофолята

в самых различных биосинтетических реакциях. Метионин синтезируется из гомоцистеина путем переноса метильной группы N^5-метилтетрагидрофолята, как будет описано ниже. Некоторые атомы углерода *пуринов* происходят из N^5, N^{10}-метенильного и N^{10}-формильного производных тетрагидрофолята. Метильная группа *тимина* (пиримидинового основания) происходит из N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолята. Это производное тетрагидрофолята служит также донором одноуглеродного фрагмента при синтезе глицина из CO_2 и NH_4^+ в реакции, катализируемой глицин-синтазой:



CO_2 + NH_4^+ + N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолят + NADN ⇄ Глицин + + Тетрагидрофолят + NAD^+.

Итак, в биосинтетических реакциях используются одноуглеродные фрагменты всех трех степеней окисления. Кроме того, *тетрагидрофолят служит акцептором одноуглеродных фрагментов в катаболических реакциях*. Основной источник одноуглеродных фрагментов – реакция превращения серина в глицин, в результате которой, как уже говорилось, образуется N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолят. Серин

Таблица 21.2. **Одноуглеродные группы, переносимые тетрагидрофолятом**

Степень окисления	Группа
Наиболее восстановленная	$—CH_3$ (метильная)
Промежуточная	$—CH_2$ (метиленовая)
Наиболее окисленная	—CHO (формильная)
	—CHNH— (формимино-)
	—CH= (метенильная)

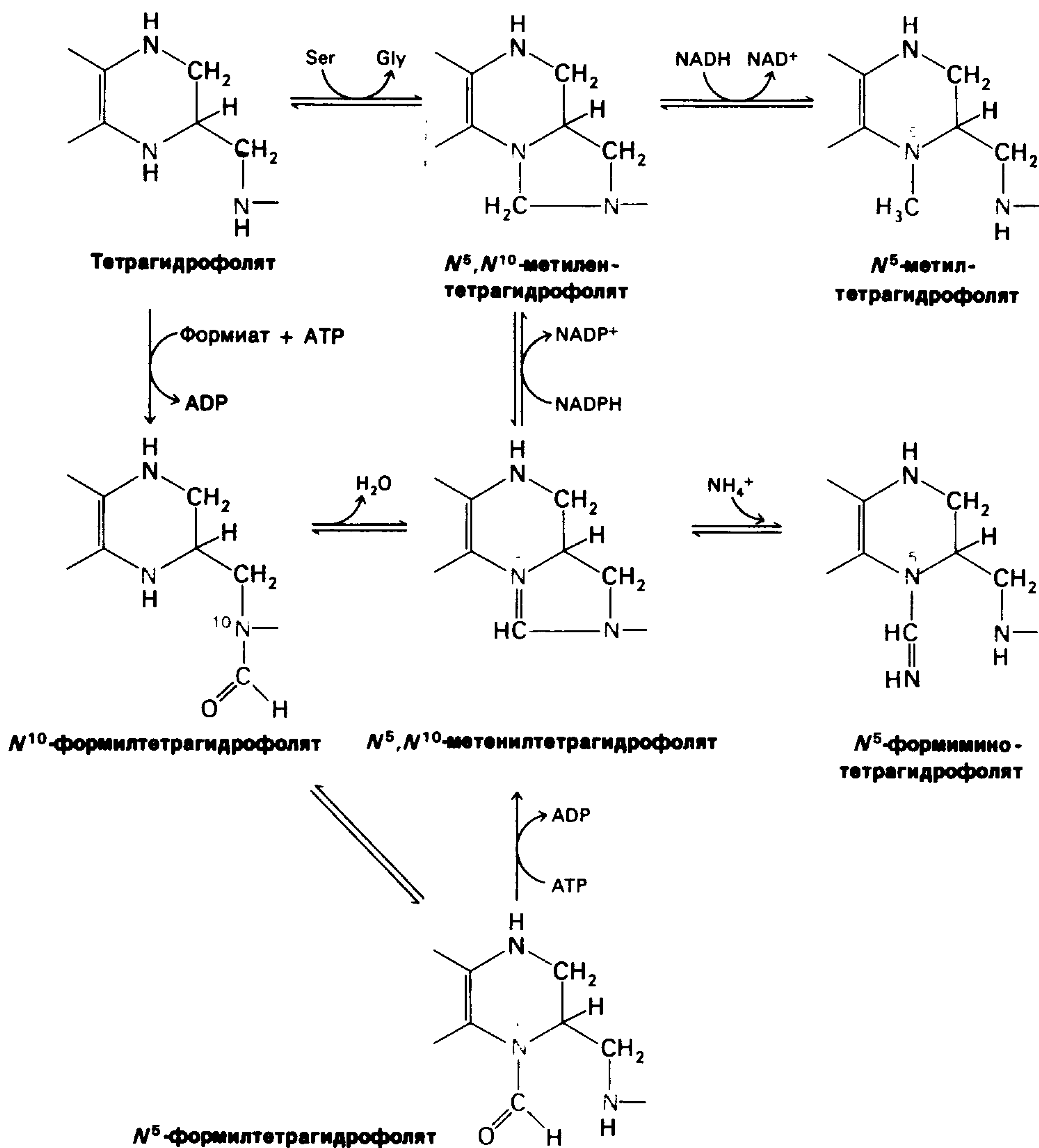


Рис. 21.5. Превращения одноуглеродных единиц, присоединенных к тетрагидрофоляту.

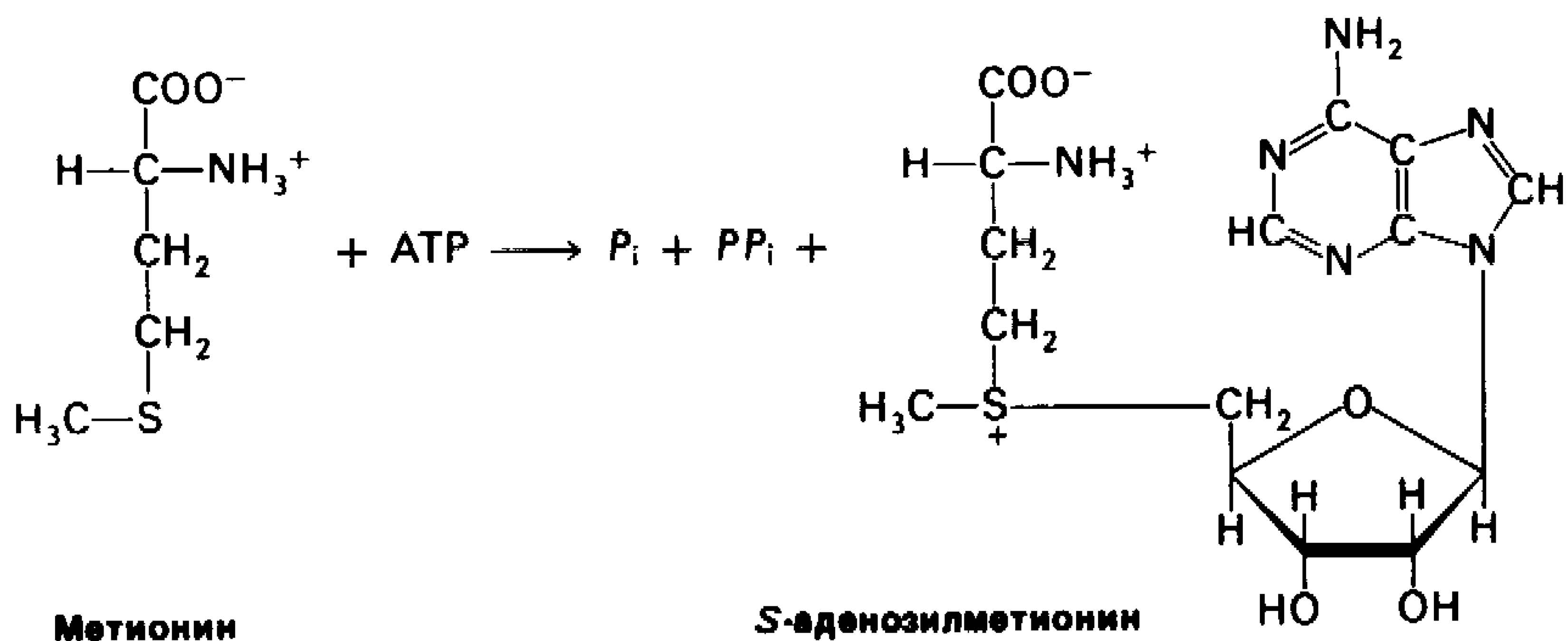


Рис. 21.6. Пространственная модель S-аденозилметионина.

может образовываться из 3-фосфоглицерата (разд. 21.5); таким образом, *благодаря этой последовательности реакций клетка имеет возможность образовывать одноуглеродные фрагменты из углеводов de novo.* При распаде гистидина образуется N-формиминоглутамат, который переносит свою формиминогруппу на N^5-атом тетрагидрофолята.

21.7. S-аденозилметионин – основной донор метильных групп

Тетрагидрофолят может нести метильную группу при N^5, однако присущий ему потенциал переноса групп недостаточно высок. В большинстве процессов биосинтеза донором активированной метильной группы

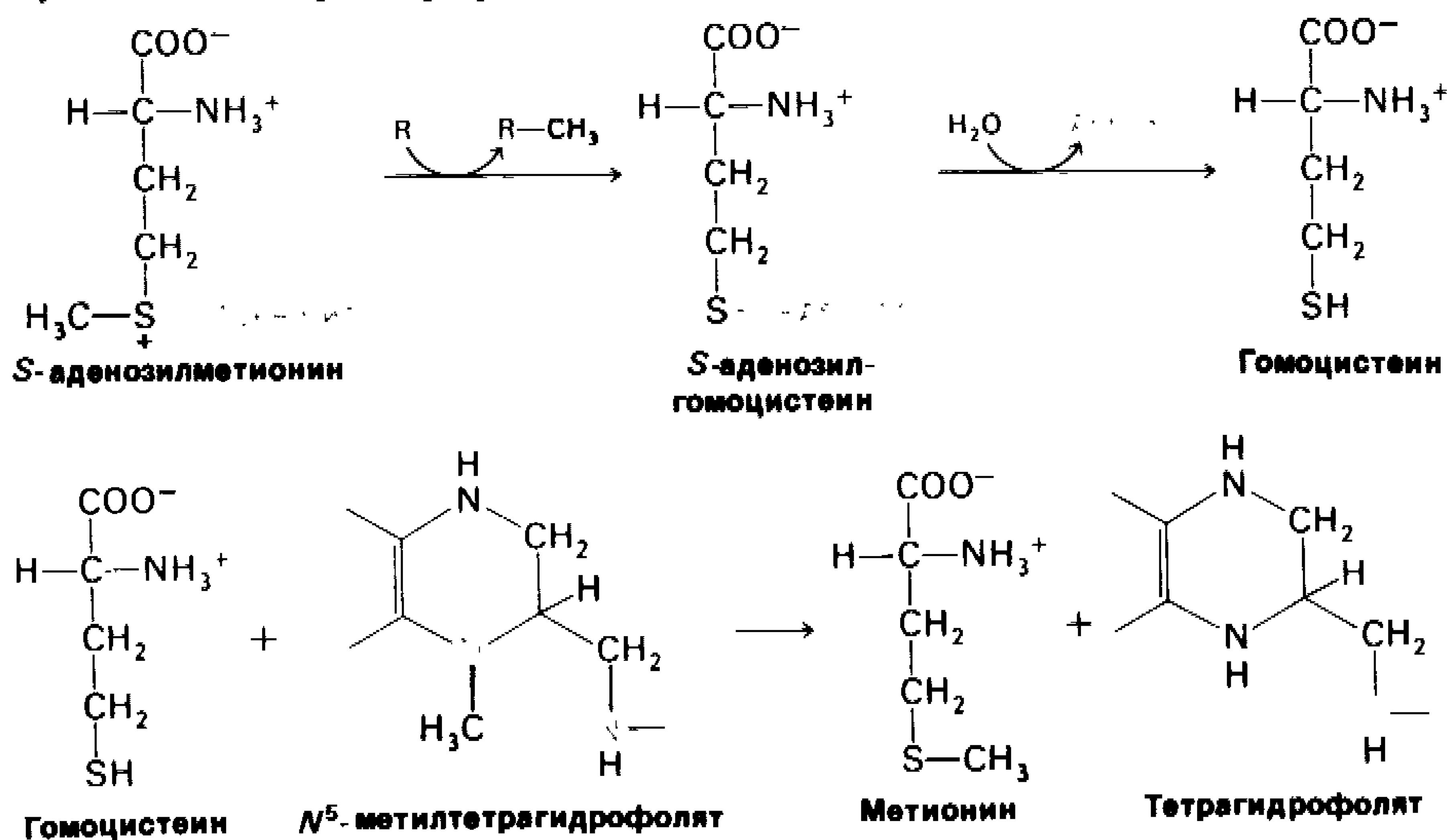


служит *S-аденозилметионин*, с которым мы уже встречались, когда рассматривали превращение фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин (разд. 20.3). S-аденозилметионин синтезируется путем переноса аденозильной группы АТР на атом серы метионина. Метильная группа метионина активируется под действием положительного заряда соседнего атома серы, поэтому ее реакционная способность значительно выше, чем у N^5-метилтетрагидрофолята.

переносе метильной группы S-аденозилметионина на какой-нибудь акцептор, например фосфатидилэтаноламин. Затем S-аденозилгомоцистеин гидролизуется на *гомоцистеин* и аденозин.

Метионин может быть регенерирован путем переноса метильной группы N^5-метилтетрагидрофолята. Эту реакцию катализирует *гомоцистеин-метилтрансфераза*.

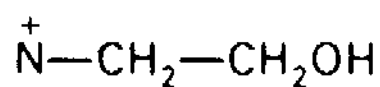
В этом переносе метильной группы уча-

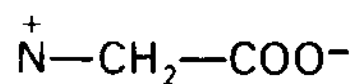


Синтез S-аденозилметионина необычен в том отношении, что пирофосфатная группа АТР расщепляется на пирофосфат и ортофосфат. Затем пирофосфат гидролизуется. Таким образом, при этой реакции активации все связи фосфор—кислород в АТР расщепляются, что существенно увеличивает реакционную способность метильной группы.

S-аденозилгомоцистеин образуется при

ствует в качестве посредника *метилкобаламин*, кофермент гомоцистеин-метилтрансферазы. Вообще у млекопитающих известна еще только одна реакция, для которой необходим витамин B_{12},–это перестройка L-метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА (разд. 18.11). В метилировании гомоцистеина с образованием метионина могут принимать участие и другие доноры, такие, как *бетаин*, продукт окисления холина.

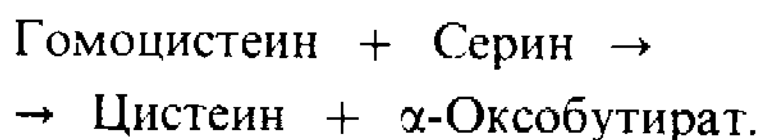




Эти реакции образуют *цикл активированной метильной группы* (рис. 21.7). Метильные группы вступают в цикл при превращении гомоцистеина в метионин и становятся весьма реакционноспособными в результате расщепления трех высокоэнергетических связей ($\sim$ P). Высокий потенциал переноса метильной группы S-аденозилметионина делает возможным ее перенос на самые разнообразные акцепторы, например на аминогруппу нейропередатчика норадреналина (разд. 37.11) и на остаток глутаминовой кислоты одного из регуляторных белков хемотаксиса (разд. 37.23).

21.8. Цистеин синтезируется из серина и гомоцистеина

Кроме того, что гомоцистеин-предшественник метионина в цикле активированной метильной группы, он является также промежуточным продуктом синтеза цистеина. Серин и гомоцистеин конденсируются с образованием *цистатионина* (рис. 21.8). Эту реакцию катализирует пиридоксалевый фермент цистатионин-синтетаза. Затем цистатионин дезаминируется и расщепляется на цистеин и α-оксобутират под действием еще одного пиридоксалевого фермента *цистатиониназы*. Суммарное уравнение этих двух реакций имеет следующий вид:


Гомоцистеин + Серин →

→ Цистеин + α-Оксобутират.

Обратите внимание, что атом серы цистеина происходит из гомоцистеина, тогда как углеродный скелет-из серина.

На этом мы закончим обсуждение биосинтеза заменимых аминокислот. Образование тирозина путем гидроксилирования фенилаланина рассматривалось ранее (разд. 18.16)

21.9. Шикимат и хоризмат-промежуточные продукты биосинтеза ароматических аминокислот

Теперь обратимся к биосинтезу незаменимых аминокислот, пути образования которых гораздо сложнее, чем пути образования заменимых аминокислот. Для обсуждения мы выбрали два синтеза-ароматических аминокислот и гистидина.

Синтез фенилаланина, тирозина и триптофана у *E.coli* идет по общему пути (рис. 21.9). Первая стадия-конденсация фосфоенолпирувата (промежуточного продукта гликолиза) с эритрозо-4-фосфатом (промежуточный продукт пентозофосфатного пути). Образующийся семиуглеродный сахар теряет фосфорильную группу и циклизуется с образованием 5-дегидрохинной кислоты. Дегидратация дает 5-дегидрошикимат, который восстанавливается с помощью NADPH до *шикимата* (рис. 21.10). Затем еще одна молекула фосфоенолпирувата конденсируется с 5-фосфошикиматом:

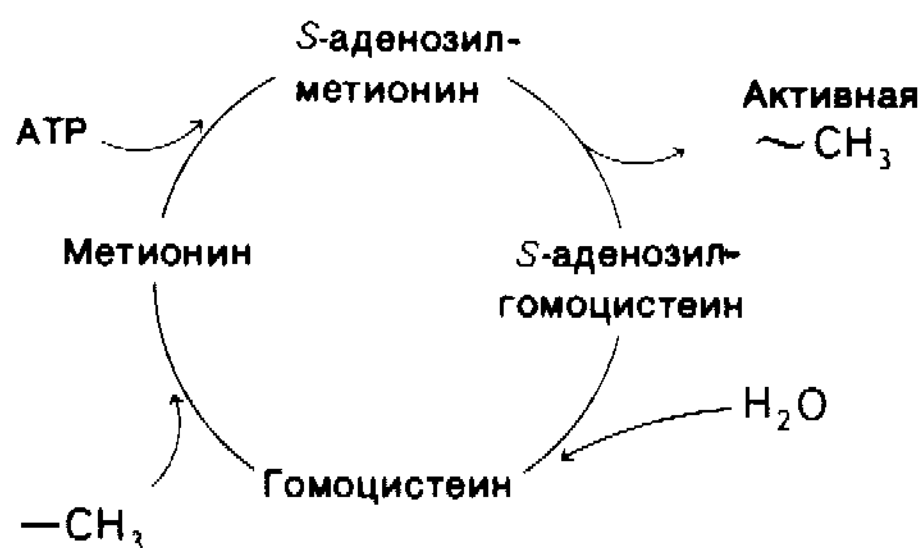


Рис. 21.7. Цикл активированной метильной группы.

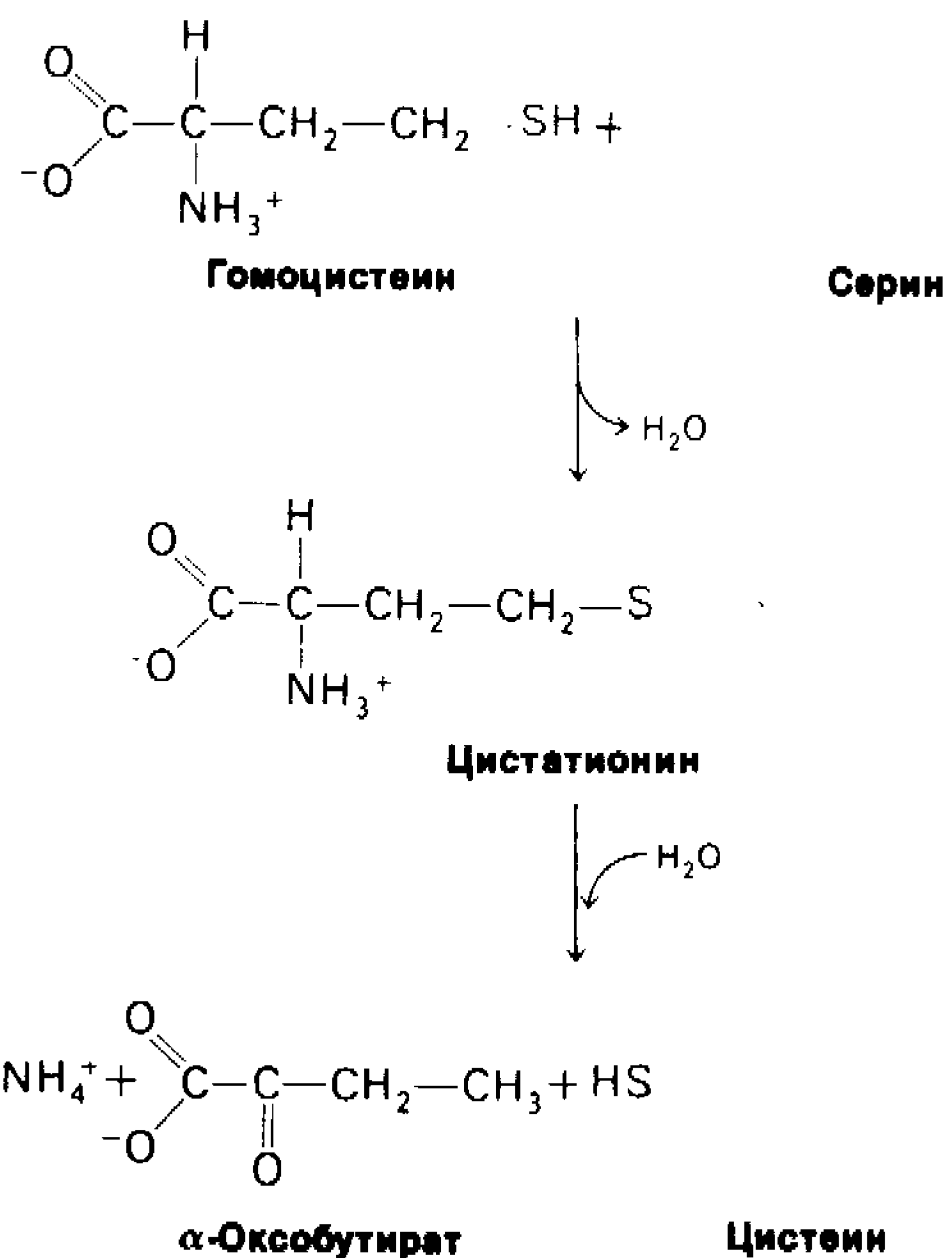


Рис. 21.8. Синтез цистеина.



Рис. 21.9. Путь биосинтеза ароматических аминокислот у *E. coli*.

образовавшийся продукт теряет фосфатную группу и превращается в *хоризмат*.

После образования хоризмата путь биосинтеза раздваивается. Проследим вначале *ветвь синтеза префената* (рис. 21.11).

В реакции, катализируемой мутазой, хоризмат превращается в префенат, непосредственный предшественник ароматического кольца фенилаланина и тирозина. В результате реакций дегидратации и декарбоксилирования префената образуется *фенилпируват*. Кроме того, окислительное декарбоксилирование префената дает *n-гидроксифенилпируват*. Эти α-оксокислоты подвергаются переаминированию, образуя *фенилаланин* и *тирозин* соответственно.

Ветвь, которая начинается с синтеза *антранилата*, приводит к синтезу *триптофана*. К хоризмату присоединяется аминогруппа боковой цепи глутамина и образуется антранилат. Вообще *глутамин служит донором аминогрупп во многих реакциях биосинтеза*. Затем антранилат конденсируется с *фосфорибозилпирофосфатом* (ФРПФ), *активированной формой рибозофосфата*. Кроме того, ФРПФ - ключевой промежуточный продукт синтеза гистидина, а также пурин- и пиримидиннуклеотидов (разд. 22.3). Атом С-1 рибозо-5-фосфата связывается с атомом азота антранилата. Движущая сила этой реакции – гидролиз пирофосфата.

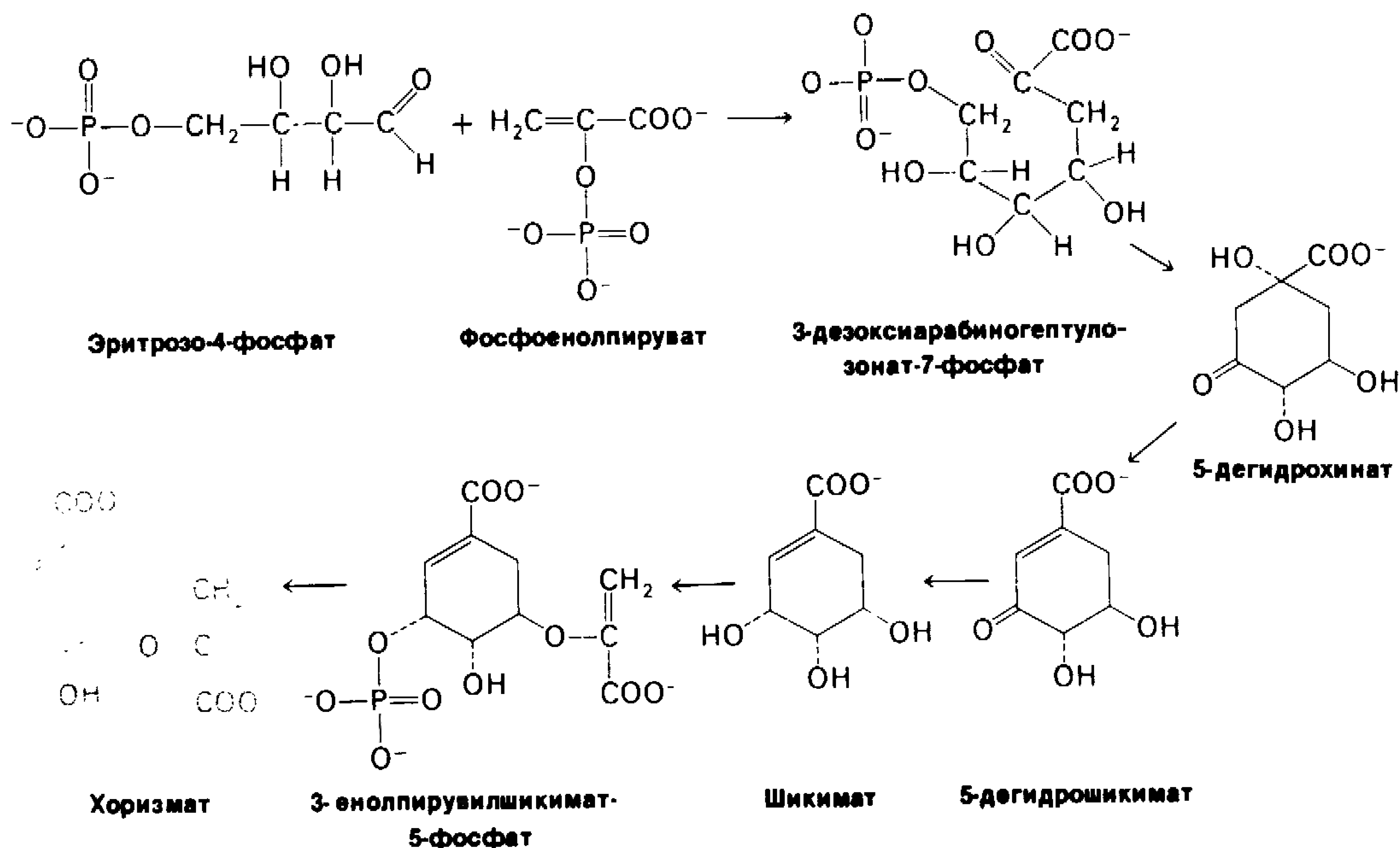
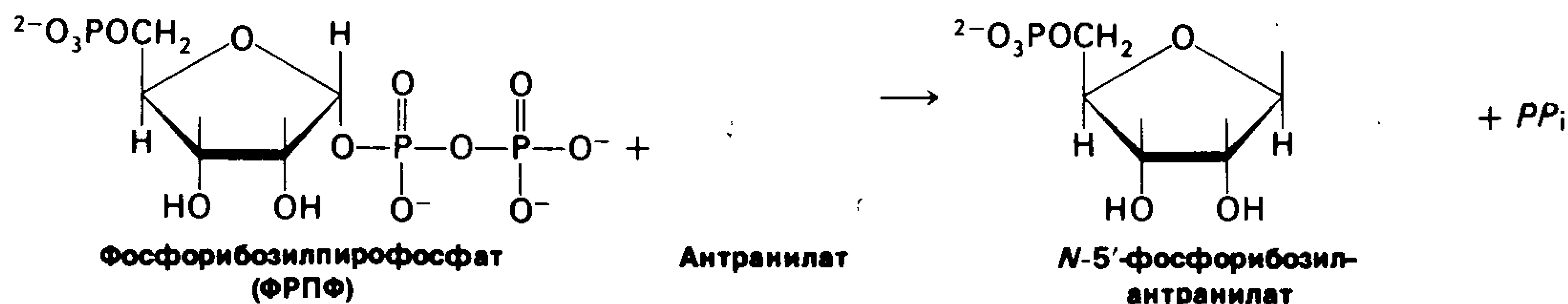


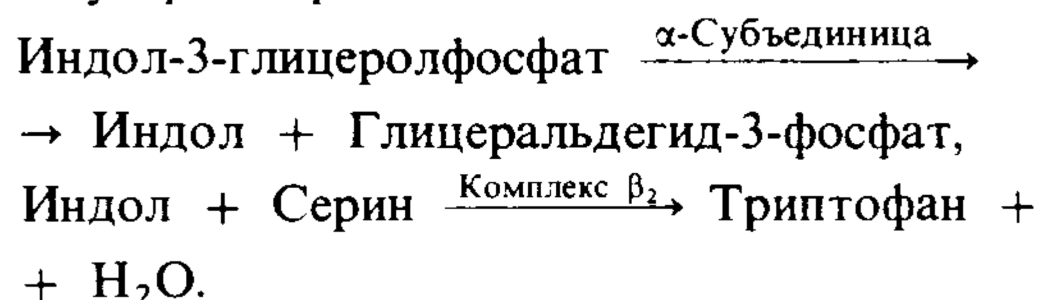
Рис. 21.10. Синтез хоризмата, промежуточного продукта в биосинтезе фенилаланина, тирозина и триптофана в клетках *E. coli*.

Рибозный остаток фосфориболизантранилата претерпевает перестройку (рис. 21.12) с образованием 1-(О-карбоксифениламино)-1-дезоксирибулозо-5-фосфата. Этот промежуточный продукт расщепляется и декарбоксилируется с образованием *индол-3-глицеролфосфата*. Наконец, индол-3-глицерол-



фосфат реагирует с серином, образуя *триптофан.* Глицерофосфатная боковая цепь индол-3-глицеролфосфата заменяется углеродным скелетом и аминогруппой серина. Эта реакция катализируется триптофан-синтазой.

Триптофан-синтаза E.coli имеет субъединичное строение $\alpha_2\beta_2$. Фермент можно диссоциировать на две α-субъединицы и комплекс β_2. По отдельности они катализируют частичные реакции, приводящие к синтезу триптофана:



Индол-3-глицеролфосфат $\xrightarrow{\alpha\text{-Субъединица}}$

→ Индол + Глицеральдегид-3-фосфат,

Индол + Серин $\xrightarrow{\text{Комплекс } \beta_2}$ Триптофан +

+ H_2O.

Каждый активный участок β_2 содержит в качестве простетической группы пиридоксальфосфат. *При образовании комплекса* $\alpha_2\beta_2$ *каталитические свойства его компонентов* α *и* β_2 заметно меняются. Скорости частичных реакций под действием комплекса $\alpha_2\beta_2$ более чем в 10 раз превышают скорости реакций, катализируемых отдельными субъединицами. Более того, синтез триптофана под действием $\alpha_2\beta_2$ осуществляется с помощью согласованного механизма. Индол, образовавшийся в первой частичной реакции, сразу же реагирует с серином, не высвобождаясь из комплекса с $\alpha_2\beta_2$. Таким образом, взаимодействия между субъединицами мультисубъединичного фермента могут изменять его каталитические свойства.

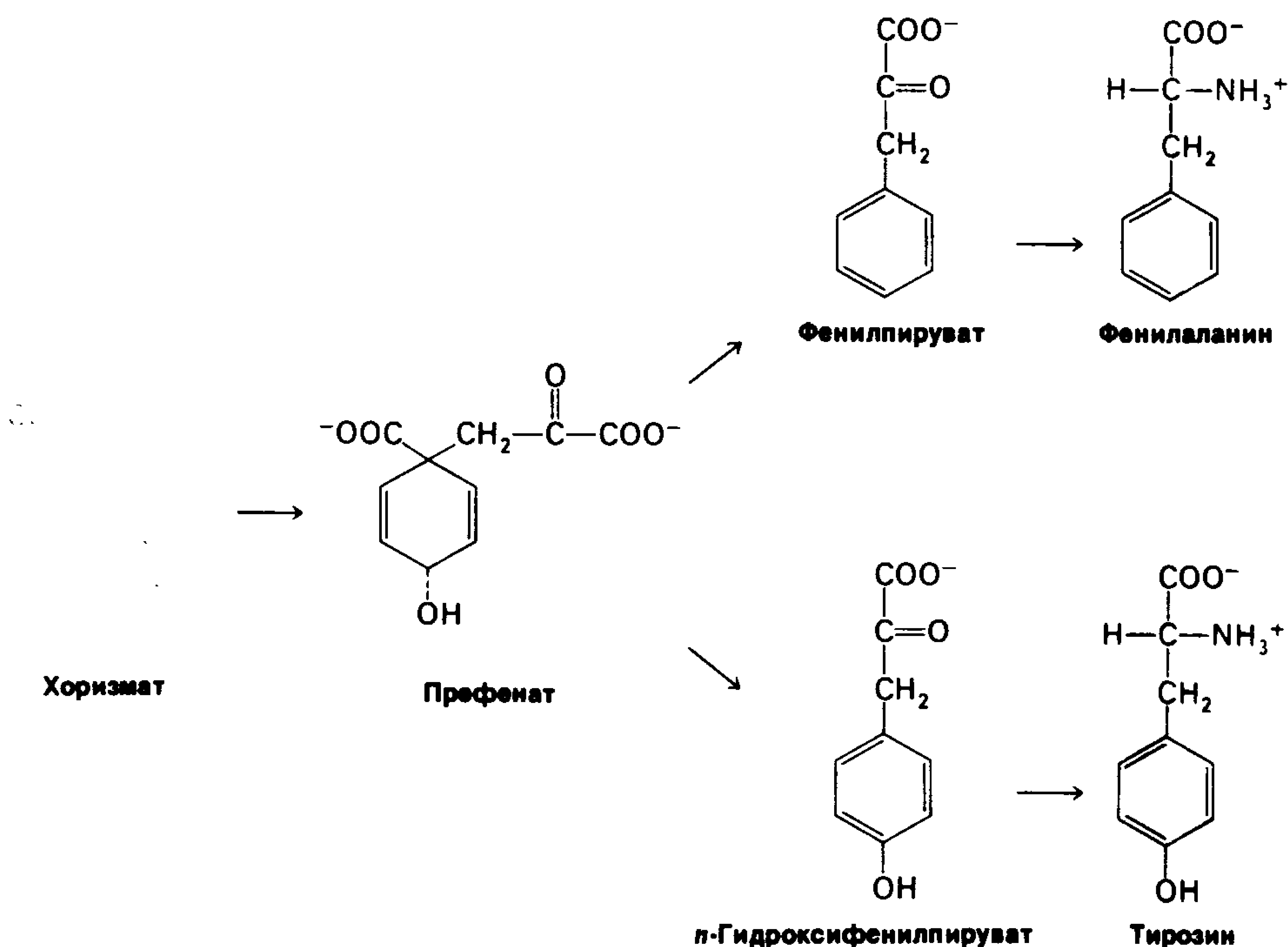


Рис. 21.11. Синтез тирозина и фенилаланина из хоризмата.

16–31

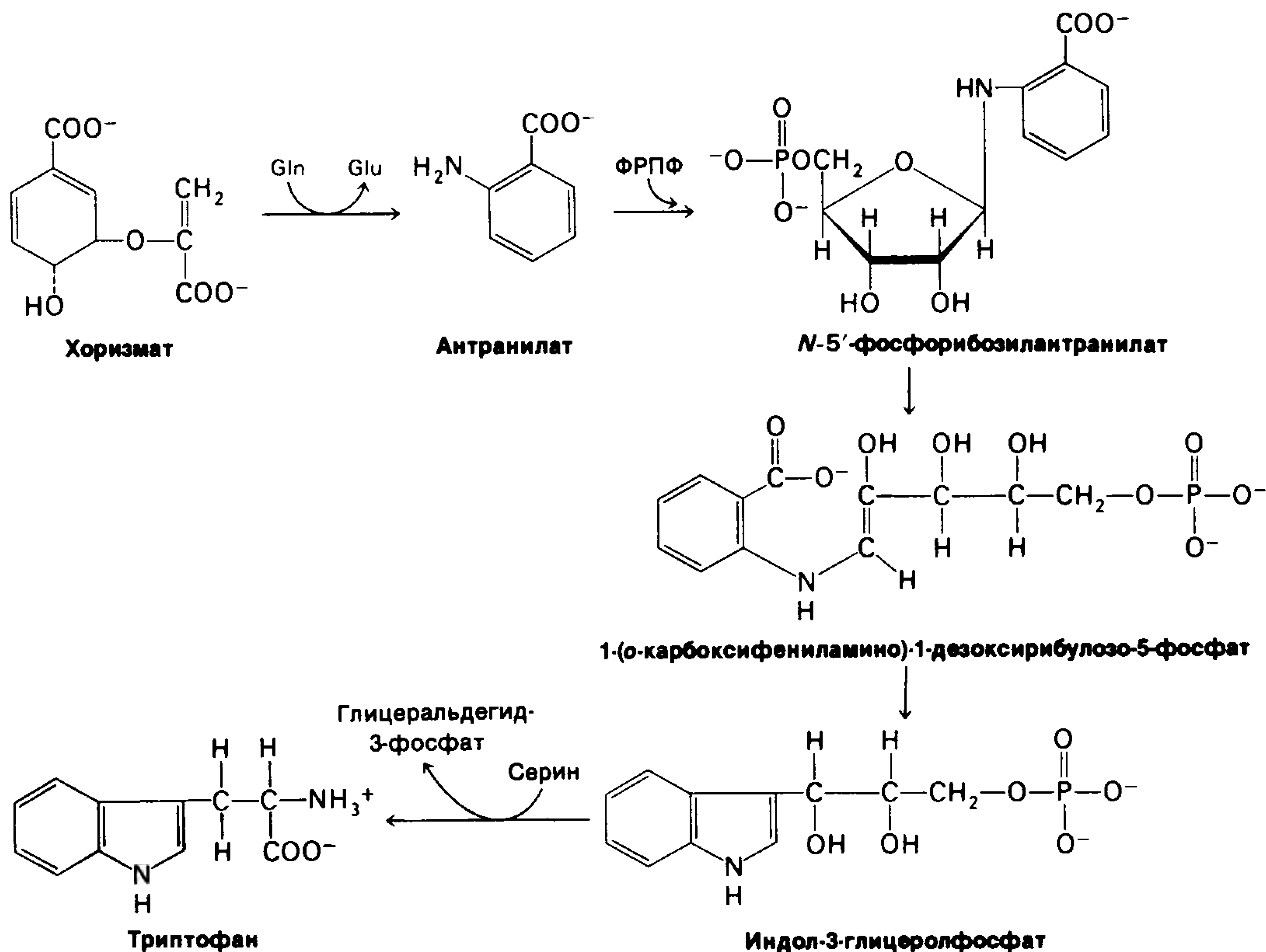


Рис. 21.12. Синтез триптофана из хоризмата.

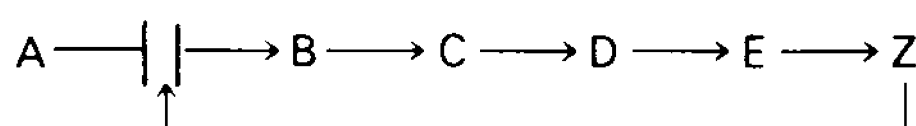
21.10. Гистидин синтезируется из ATP, ФРПФ и глутамина

Пути биосинтеза гистидина в клетках *E.coli* и *Salmonella* обладают многими сложными и новыми для нас особенностями (рис. 21.14). Последовательность реакций начинается с конденсации ATP и ФРПФ, при которой N-1 пуринового кольца связывается с C-1 рибозной группы ФРПФ. Что касается готовой молекулы, то пять атомов углерода гистидина происходят из ФРПФ. Адениновый остаток ATP дает азот и один углеродный атом имидазольного кольца гистидина. Второй атом азота имидазольного кольца происходит из боковой цепи глутамина. Важная особенность этого пути состоит в том, что рибонуклеотид 5-аминоимидазол-4-карбоксамида, образующийся при реакции расщепления с образованием имидазольного кольца, служит промежуточным продуктом в биосинтезе пуринов (разд. 22.4). Таким образом, пути биосинтеза гистидина и пуринов оказываются взаимосвязанными.

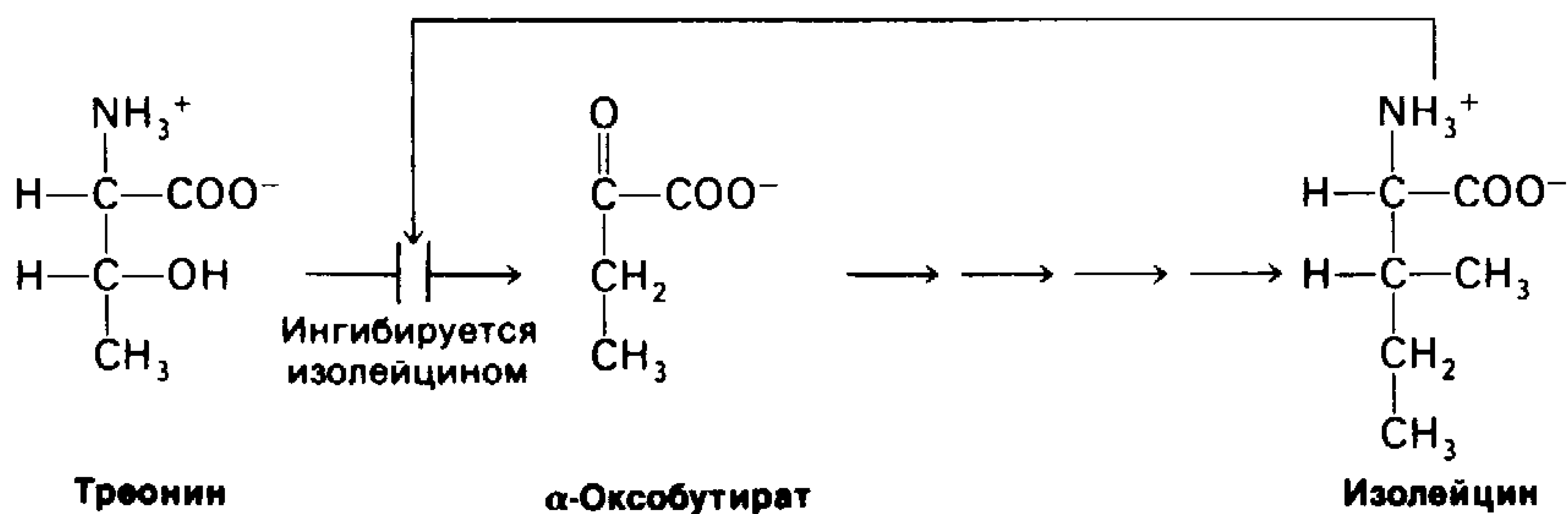
21.11. Биосинтез аминокислот регулируется ингибированием конечным продуктом

Скорость синтеза аминокислот зависит главным образом от *количества* ферментов биосинтеза и от их *ферментативной активности*. Перейдем теперь к регуляции ферментативной активности. Регуляция синтеза ферментов будет обсуждаться в гл. 28.

Первая необратимая реакция пути биосинтеза, которая называется направляющей реакцией, или решающим этапом (решающей реакцией),– обычно важный участок регуляции. *Конечный продукт пути (Z) часто ингибирует фермент, катализирующий первую решающую реакцию* (A → B).



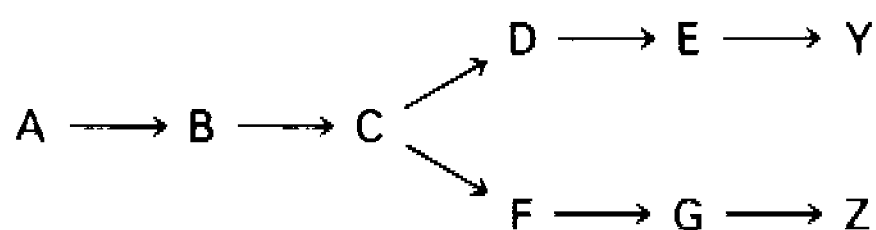
Регуляция такого рода необходима для сохранения строительных блоков и метаболической энергии. Первый пример этого важного принципа регуляции метаболизма был



обнаружен при изучении биосинтеза изолейцина в клетках *E.coli*. Дегидратация и дезаминирование треонина с образованием α-оксобутирата – решающая реакция в синтезе изолейцина. Катализирующий эту реакцию пиридоксалевый фермент *треониндезаминаза* аллостерически ингибируется изолейцином.

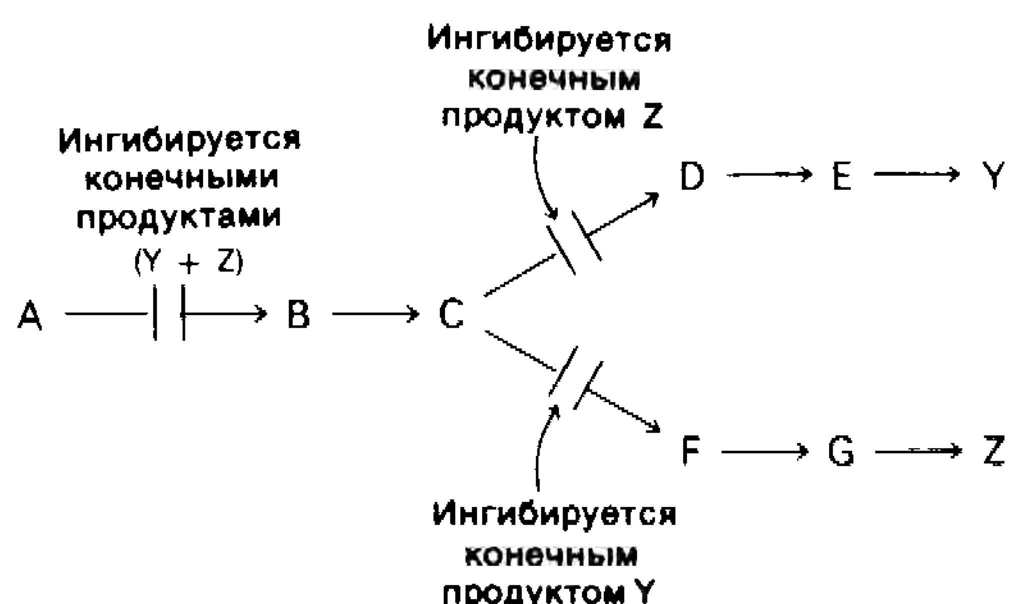
Подобно этому, триптофан ингибирует ферментный комплекс, катализирующий первые две стадии превращения хоризмата в триптофан.

Рассмотрим разветвляющийся биосинтетический путь, конечные продукты которого Y и Z.



Предположим, что высокая концентрация Y или Z полностью ингибирует первую общую стадию (A → B). Тогда при высокой концентрации Y будет подавлен синтез Z, даже если его содержание ниже необходимого уровня. Очевидно, такая схема регуляции не оптимальна. В действительности в разветвленных биосинтетических путях было обнаружено несколько тонких регуляторных механизмов.

1. *Последовательная регуляция по принципу обратной связи.* Первая общая реакция (A → B) непосредственно не ингибируется продуктами Y или Z. Вместо этого конечные продукты ингибируют начальные реакции каждой из ветвей: Y ингибирует реакцию C → D, а Z – реакцию C → F. Высокая концентрация C в свою очередь ингибирует реакцию A → B. Таким образом, первая общая реакция блокируется только в том случае, если оба конечных продукта присутствуют в избытке.



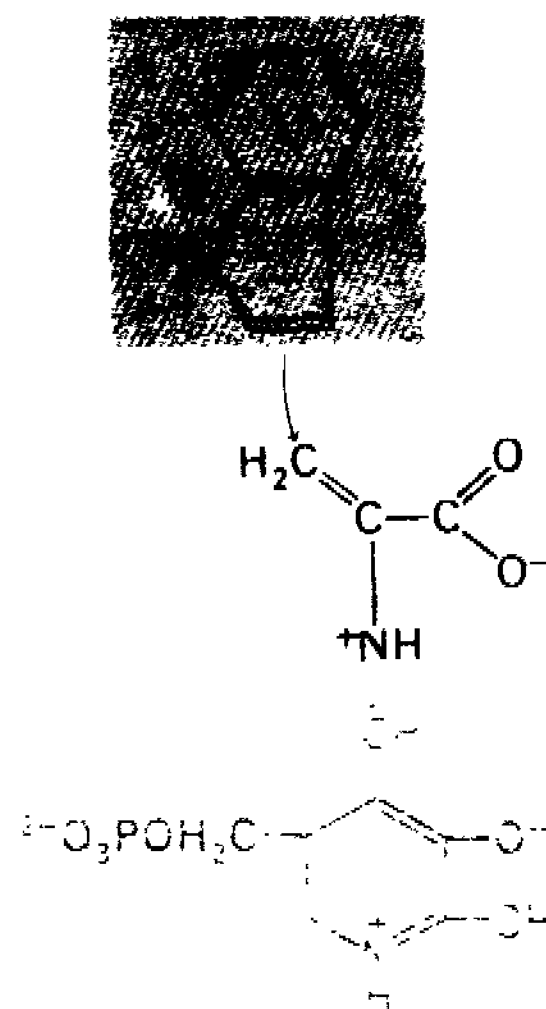


Рис. 21.13. Предполагаемый промежуточный продукт при синтезе триптофана. Серин образует шиффово основание с ПЛФ, связанным с β-цепью белка, которое затем дегидратируется и образует шиффово основание аминоакрилата (показано красным цветом). Этот связанный с ферментом промежуточный продукт атакуется индолом, продуктом другой частичной реакции, катализируемой α-субъединицей белка. В результате образуется триптофан.

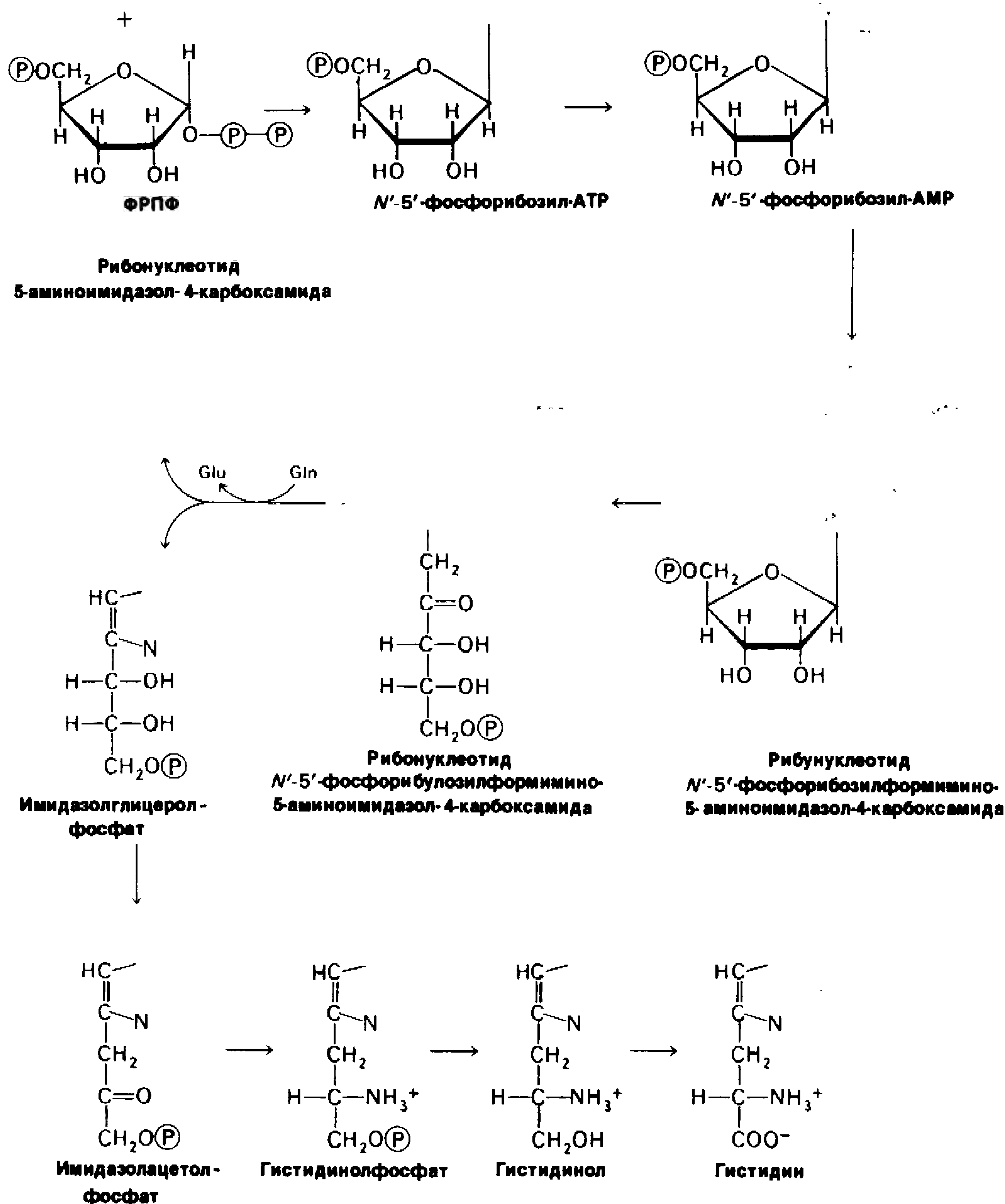
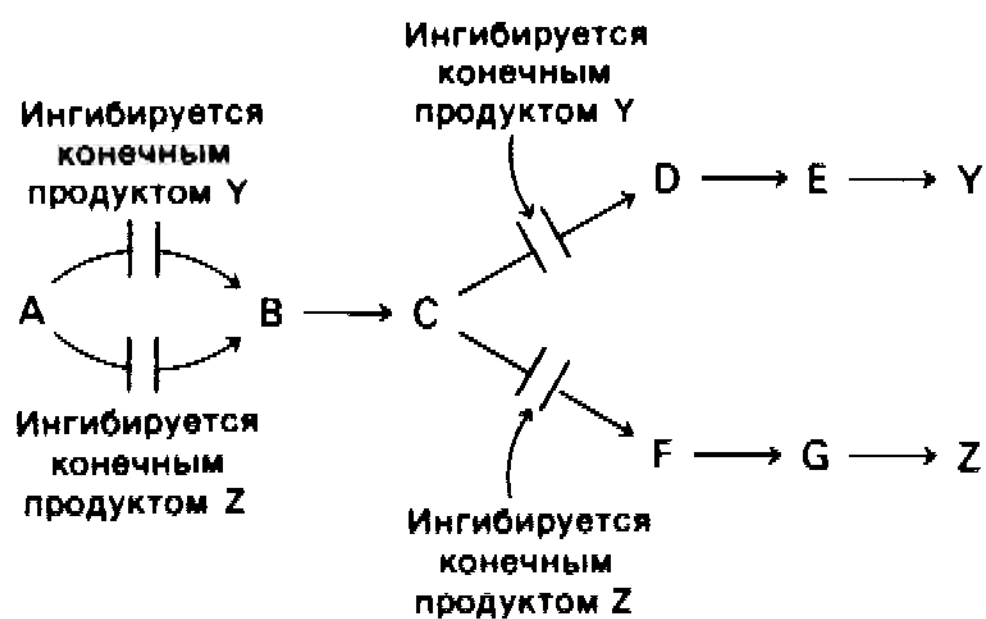


Рис. 21.14. Биосинтез гистидина в клетках *E. coli* и *Salmonella* (буквой P в кружочке обозначена фосфорильная группа).

Последовательная регуляция конечным продуктом действует при синтезе ароматических аминокислот в клетках *Bacillus subtilis*. Первые реакции после разветвления общего пути биосинтеза фенилаланина, тирозина и триптофана ингибируются соответствующими конечными продуктами.

Если все три продукта присутствуют в избытке, происходит накопление хоризмата и префената. Эти промежуточные продукты, синтезирующиеся в реакциях перед точкой разветвления путей, в свою очередь ингибируют первую общую реакцию всего биосинтетического пути – конденсацию фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата.

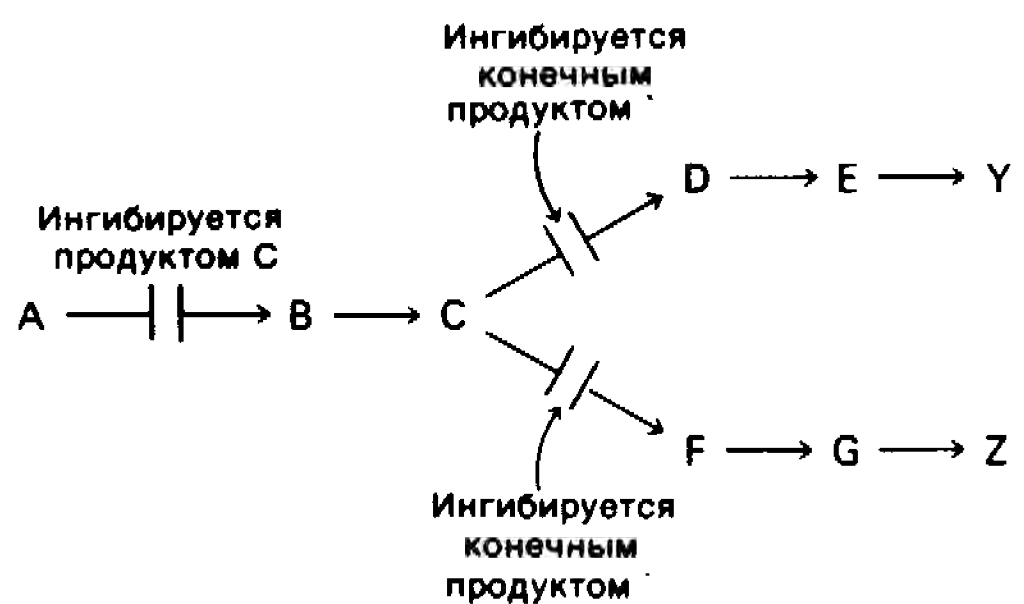
2. *Множественность ферментов.* Отличительное свойство этого механизма то, что первая общая реакция (A → B) катализируется двумя различными ферментами. Один из них ингибируется продуктом Y, а другой – продуктом Z. Таким образом, чтобы полностью предотвратить превращение A в B, концентрации и Y, и Z должны быть высокими. Кроме того, при такой схеме регуляции, как и при последовательной регуляции по типу обратной связи, Y ингибирует реакцию C → D, а Z – реакцию C → F.



Дифференциальное ингибирование множества ферментов используется для регуляции многочисленных метаболических путей у микроорганизмов. У *E. coli* конденсация фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата катализируется тремя различными ферментами. Один из них ингибируется фенилаланином, другой – тирозином и третий – триптофаном. Кроме того, существуют две различные мутазы, превращающие хоризмат в префенат. Одна из них ингибируется фенилаланином, другая – тирозином.

3. *Согласованная регуляция по типу обратной связи.* Первая общая реакция (A → B) ингибируется только в том случае, если и Y, и Z одновременно присутствуют в высокой концентрации. При высокой концентрации лишь одного (любого) из этих продуктов ингибирования реакции A → B не происходит. Как и в первых двух схемах регуляции, Y ингибирует реакцию C → D, а Z – реакцию C → F.

Пример согласованной регуляции по типу обратной связи — ингибирование аспартил-



киназы конечными продуктами треонином и лизином.

4. *Кумулятивная регуляция по типу обратной связи.* Первая общая реакция (A → B) частично ингибируется каждым из конечных продуктов. Каждый конечный продукт действует независимо от других. Предположим, при высокой концентрации Y скорость реакции A → B снижается от 100 до 60 $с^{-1}$, а Z снижает скорость от 100 до 40 $с^{-1}$. Тогда скорость реакции A → B в присутствии высоких концентраций Y и Z будет 24 $с^{-1}$ ($0{,}6 \cdot 0{,}4 \cdot 10^2$ $с^{-1}$).

21.12. Активность глутамин-синтетазы регулируется путем аденилирования

Регуляция глутамин-синтетазы *E. coli* – впечатляющий пример *кумулятивного ингибирования по типу обратной связи.* Напомним, что глутамин синтезируется из глутамата, NH_4^+ и ATP (разд. 21.2). Глутамин-синтетаза состоит из 12 субъединиц с мол.массой 50 кДа каждая, уложенных в два параллельных гексагональных кольца (рис. 21.15). Этот фермент – ключевой регуляторный элемент метаболизма, поскольку он, как показали Эрл Стэдтман (Earl Stadtman) и его коллеги, регулирует поток азота. Амидная группа глутамина – источник азота в биосинтезе ряда соединений, например триптофана, гистидина, карбамоилфосфата, глюкозамин-6-фосфата, CTP и AMP. Глутамин-синтетаза кумулятивно ингибируется каждым из этих конечных продуктов метаболизма глутамина, а также аланином и глицином. Видимо, в молекуле этого фермента имеются участки связывания для каждого из этих ингибиторов. Ферментативная активность глутамин-синтетазы почти полностью подавляется при связывании всех восьми конечных продуктов.

Еще одно важное свойство глутамин-син-

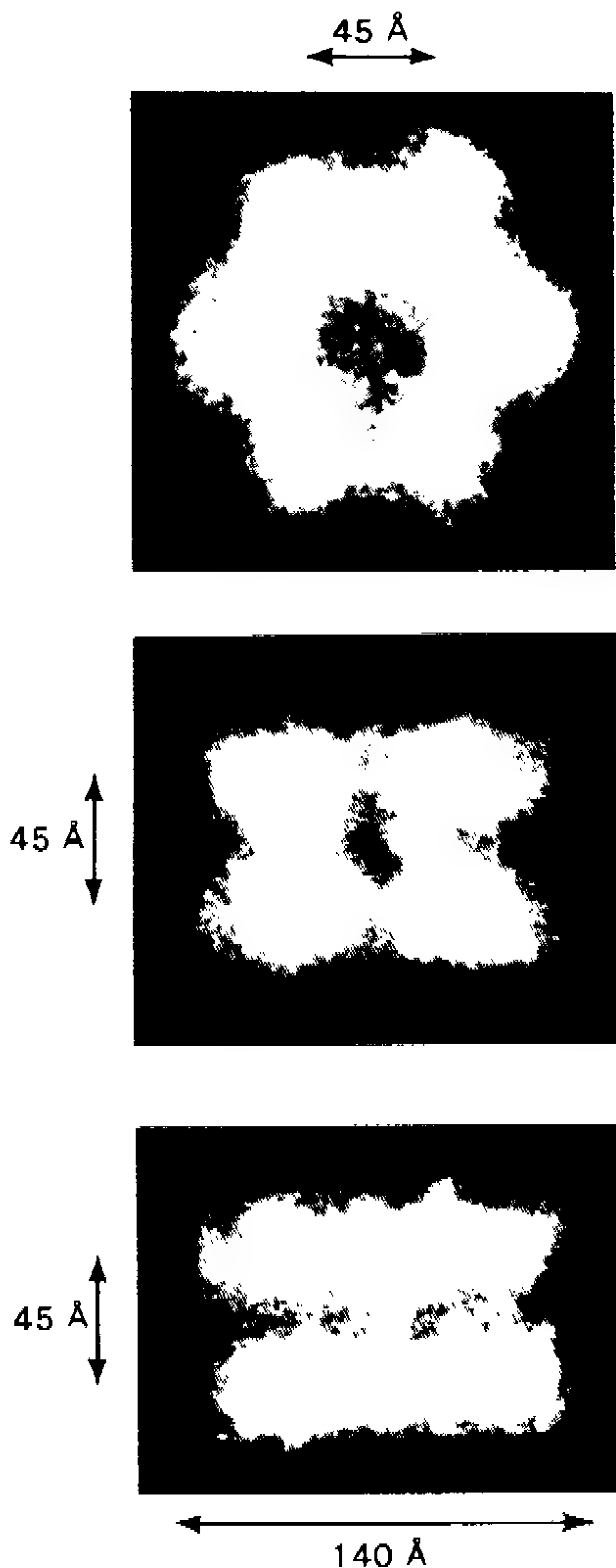
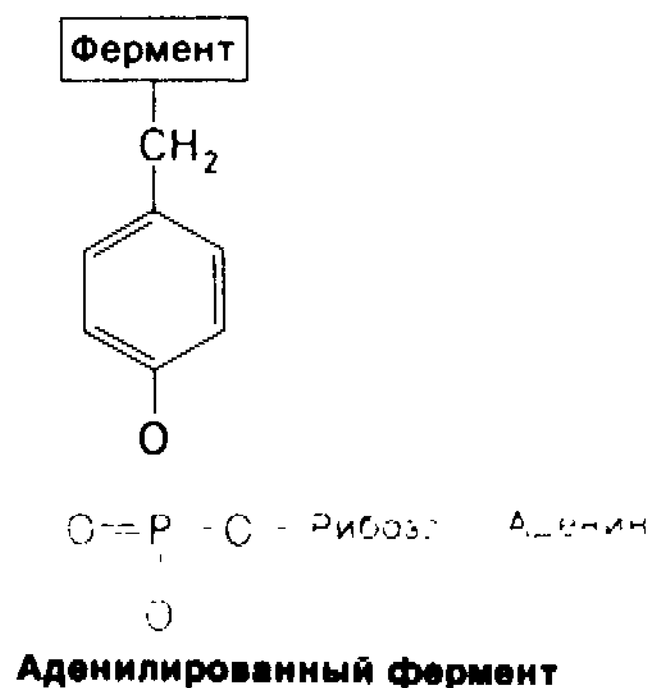


Рис. 21.15. Вид на глутамин-синтетазу *E. coli* в трех проекциях. Изображения получены путем наложения большого числа электронных микрофотографий. Двенадцать субъединиц уложены в два гексагональных кольца, расположенных в параллельных плоскостях. (Печатается с любезного разрешения д-ра Earl Stadtman.)

тетазы — *обратимая ковалентная модификация*, изменяющая ее активность (рис. 21.16). Мы уже встречались с таким механизмом ре-



Аденилированный фермент

гуляции при синтезе и распаде гликогена (разд. 16.11). Фосфорилирование активирует гликоген-фосфорилазу и инактивирует гликоген-синтазу. Активность глутамин-синтетазы регулируется в некоторой степени ковалентным присоединением *остатка AMP* к гидроксильной группе специфического остатка тирозина в каждой субъединице. *Такой аденилированный фермент более чувствителен к кумулятивному ингибированию по типу обратной связи, чем неаденилированный фермент.* Остаток AMP, ковалентно присоединенный к ферменту, может быть удален с помощью фосфоролиза. Любопытная особенность этих реакций состоит в том, что они катализируются одним и тем же ферментом, *аденилилтрансферазой*. Чем же определяется, присоединяет ли этот фермент остаток AMP или отщепляет его? Оказа-

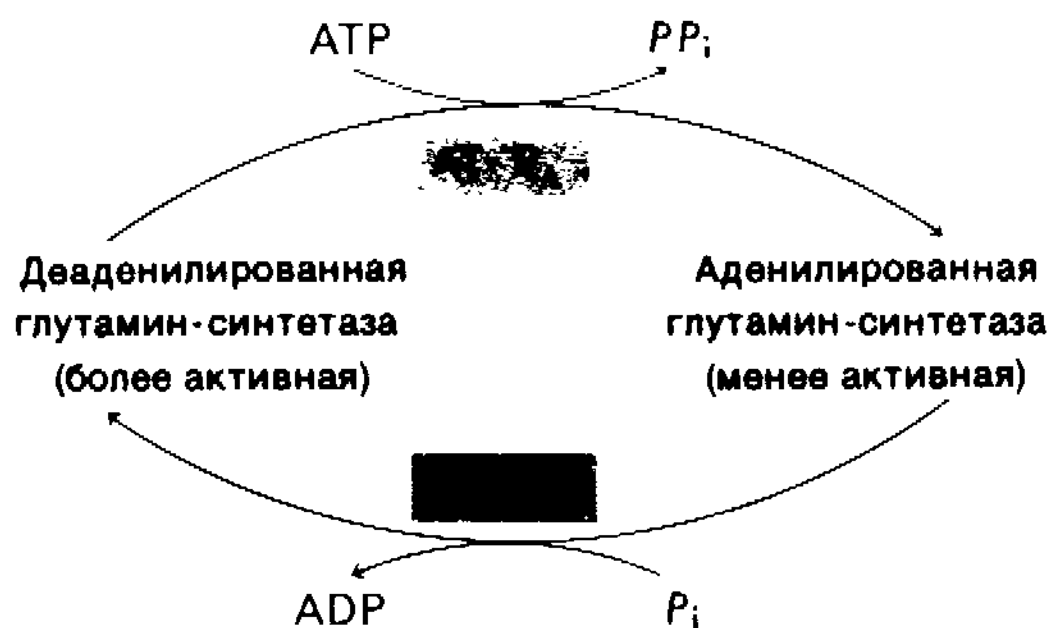


Рис. 21.16. Регуляция активности глутамин-синтетазы с помощью обратимой ковалентной модификации. Аденилирование катализируется комплексом аденилилтрансферазы (AT) и одной из форм регуляторного белка (P_A). Тот же фермент в комплексе с другой формой регуляторного белка (P_D) катализирует деаденилирование.

лось, что специфичность аденилилтрансферазы контролируется *регуляторным белком* (он обозначается буквой P), который может существовать в двух формах: P_A и P_D. Комплекс P_A—аденилаттрансфераза присоединяет AMP к глутамин-синтазе и тем самым снижает ее активность, тогда как комплекс P_D—аденилаттрансфераза отщепляет AMP. Итак, мы столкнулись с еще одним уровнем обратимой ковалентной модификации. P_A превращается в P_D путем присоединения уридинмонофосфата (UMP) (рис. 21.17). Эта реакция, которая катализируется *уридилтрансферазой*, стимулируется ATP и α-оксоглутаратом и ингибируется глутамином. Остаток UMP, присоединенный к P_D, может быть в свою очередь удален ферментативным гидролизом.

В результате этого *регуляторного каскада* при ограниченном поступлении активированных атомов азота аденилирование ингибируется, а деаденилирование стимулируется. Глутамин-синтетаза становится менее чувствительной к кумулятивному ингибированию по типу обратной связи, и поступление глутамина соответственно увеличивается. Почему для регуляции этого фермента используется каскадный механизм? Одно из преимуществ этого механизма состоит в том, что он *усиливает сигналы*, как, например, при свертывании крови (разд. 8.17) или при регуляции метаболизма гликогена (разд. 16.17). Еще одна причина состоит, видимо, в том, что *существенно возрастает возможность аллостерического контроля, так как каждый фермент каскада становится независимым объектом регуляции.* Для интеграции метаболизма азота в клетке необходимо воспринимать и перерабатывать большое количество сигналов. Возможности одного белка в этом смысле ограничены, даже если молекула настолько чувствительна, как молекула глутамин-синтетазы! Возникновение каскадной регуляции обеспечило много дополнительных регуляторных участков и позволило тонко настраивать поток азота в клетке.

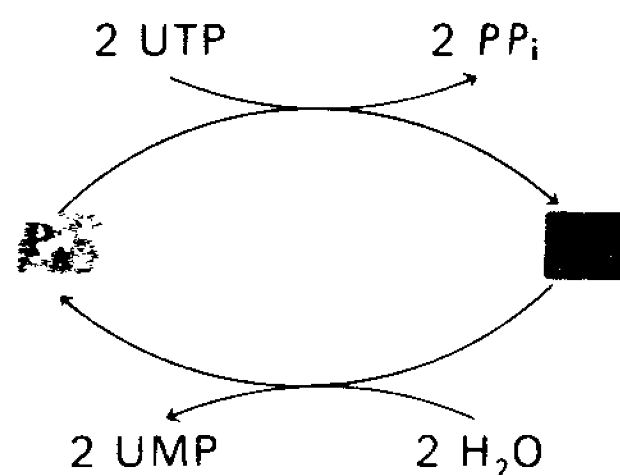


Рис. 21.17. Более высокий уровень каскадной регуляции глутамин-синтетазы. Регуляторные белки P_A и P_D, определяющие специфичность глутамин-синтетазы, способны к взаимопревращениям. P_A превращается в P_D путем уридилирования (присоединения остатка UMP). Обратная реакция происходит путем гидролиза. Ферменты, катализирующие эти реакции, «чувствуют» концентрации промежуточных продуктов метаболизма.

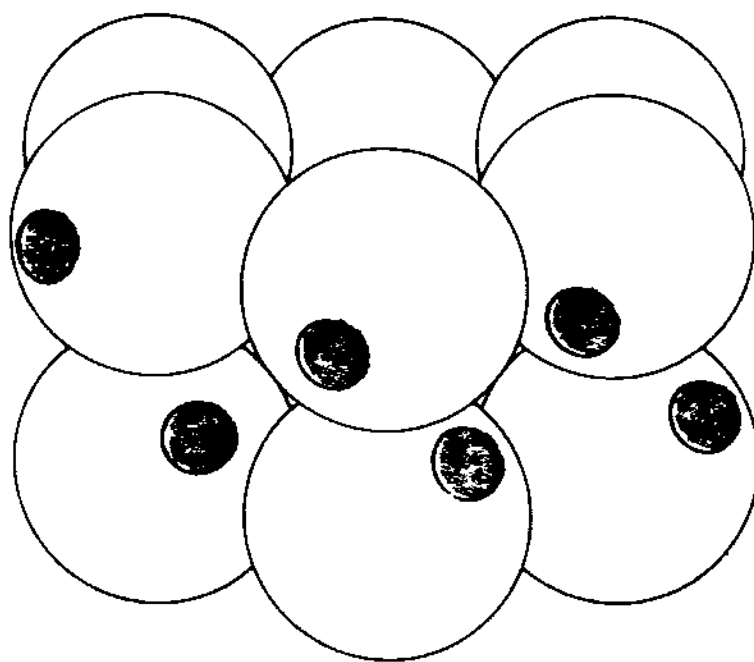
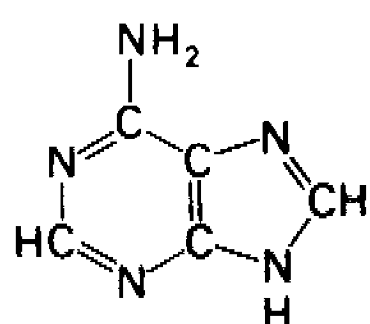
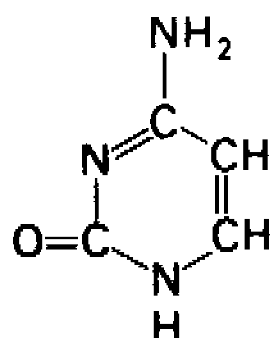


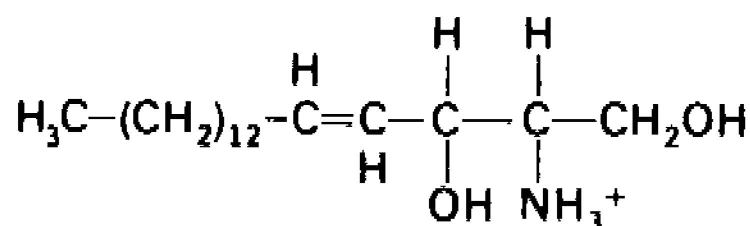
Рис. 21.18. Модель глутамин-синтетазы. Показаны периферические участки аденилирования. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром David Eisenberg.)

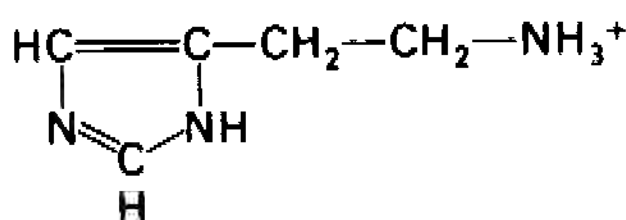
21.13. Аминокислоты – предшественники множества других биомолекул

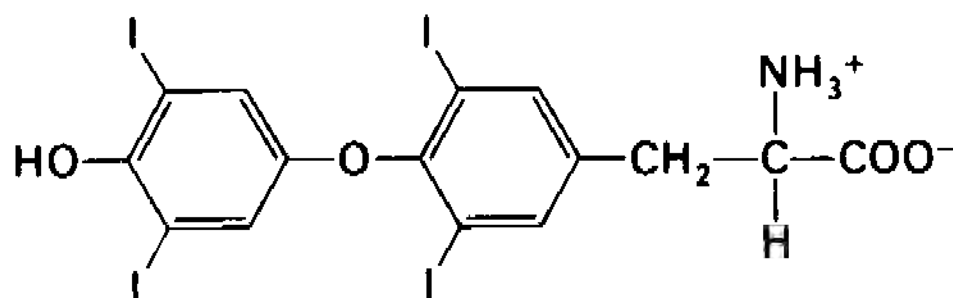
Аминокислоты – строительные блоки белков и пептидов. Они служат также предшественниками многих малых молекул, играющих важную биологическую роль. Рассмотрим вкратце некоторые молекулы, синтезирующиеся из аминокислот (рис. 21.19). *Пурины* и *пиримидины* происходят частично из аминокислот. Биосинтез этих предшественников ДНК, РНК и многих коферментов будет подробно обсуждаться в следующей главе. Шесть из девяти атомов пуриновых колец и четыре из шести атомов пиримидинового

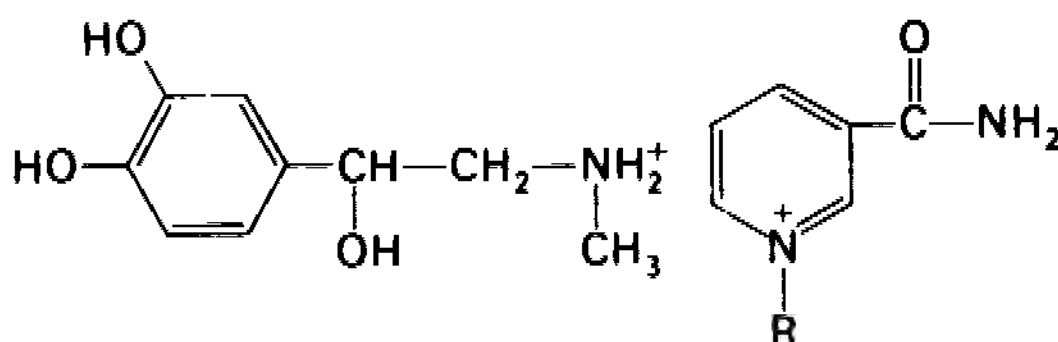












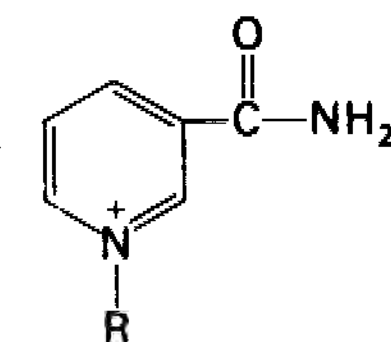
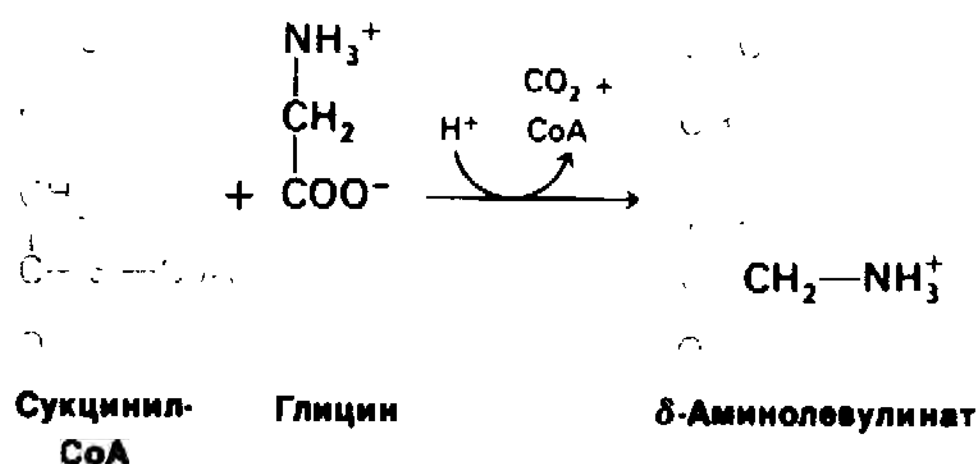


Рис. 21.19. Биомолекулы, образующиеся из аминокислот.

кольца происходят из аминокислот. Реакционноспособная концевая группировка *сфингозина*, промежуточного продукта в синтезе сфинголипидов, происходит из серина. *Гистамин*, вызывающий сильное расширение сосудов, образуется из гистидина путем декарбоксилирования. Тирозин – предшественник гормонов *тироксина* (тетраиодтиронина), а также *адреналина* и *меланина*, полимерного пигмента. Нейромедиатор *5-гидрокситриптамин* (*серотонин*) и *никотинамидное кольцо* NAD^+ синтезируются из триптофана. Глутамин поставляет амидогруппу для остатка никотинамида.

21.14. Порфирины синтезируются из глицина и сукцинил-СоА

Участие аминокислот в биосинтезе порфириновых колец гемов и хлорофиллов было вначале открыто в экспериментах по введению изотопной метки, проведенных Дэвидом Шеминым (David Shemin) и его коллегами. В 1945 г. они показали, что после введения людям с пищей ^{15}N-глицина в молекуле гема обнаруживается ^{15}N, однако после введения ^{15}N-глутамата включение метки оказывается незначительным. С помощью углерода-14, который как раз к этому времени стал доступен для исследователей, они установили, что в ядерных эритроцитах уток 8 углеродных атомов гема происходят из α-углерода глицина; ни один атом не происходит из карбоксильных углеродов (рис. 21.20). Дальнейшие исследования показали, что остальные 26 атомов гема могут происходить из ацетата. Более того, атомы ^{14}C меченного по метильной группе ацетата обнаруживаются в виде 24 из 26 атомов углерода гема, а атомы ^{14}C из ацетата, меченного по карбоксилу, обнаруживаются только в двух других атомах. Таким образом, в результате проведенного эксперимента была обнаружена четкая картина распределения метки, на основе которой Шемин высказал предположение, что предшественник гема образуется путем конденсации глицина с активированным соединением сукцината. Действительно, *первый этап биосинтеза порфиринов – конденсация глицина и сукцинил-СоА с образованием δ-аминолевулината.*



Эта реакция катализируется δ-аминолевулинат-синтазой, пиридоксалевым ферментом митохондрий. Как и следовало ожидать, эта решающая реакция в биосинтезе порфиринов регулируется. Затем две молекулы δ-аминолевулината конденсируются с образованием *порфобилиногена*. Эта реакция дегидратации катализируется δ-аминолевулинат-дегидратазой.

Четыре молекулы порфобилиногена конденсируются по типу «голова к хвосту», образуя *линейный тетрапиррол*, который остается связанным с ферментом (рис. 21.21). На каждый образовавшийся метиленовый мостик высвобождается один ион аммония. Этот линейный тетрапиррол циклизуется, теряя NH_4^+. Циклический продукт - уропорфириноген III, в котором укладка боковых цепей асимметрична. В этих реакциях участвуют *синтетаза* и *косинтетаза*. В присутствии одной синтетазы образуется симметричный продукт уропорфириноген I. Косинтетаза необходима для изомеризации одного из пиррольных колец и образования асимметричного уропорфириногена III.

Теперь скелет порфирина готов. Последующие реакции модифицируют его боковые цепи и повышают его непредельность (рис. 21.21). *Копропорфириноген III* образуется при декарбоксилировании боковых ацетатных цепей. После образования двойных связей в порфириновом кольце и превращения двух боковых цепей пропионовой кислоты в винильные группы возникает *протопорфирин IX*. Наконец, после хелатирования железа образуется *гем* - про-

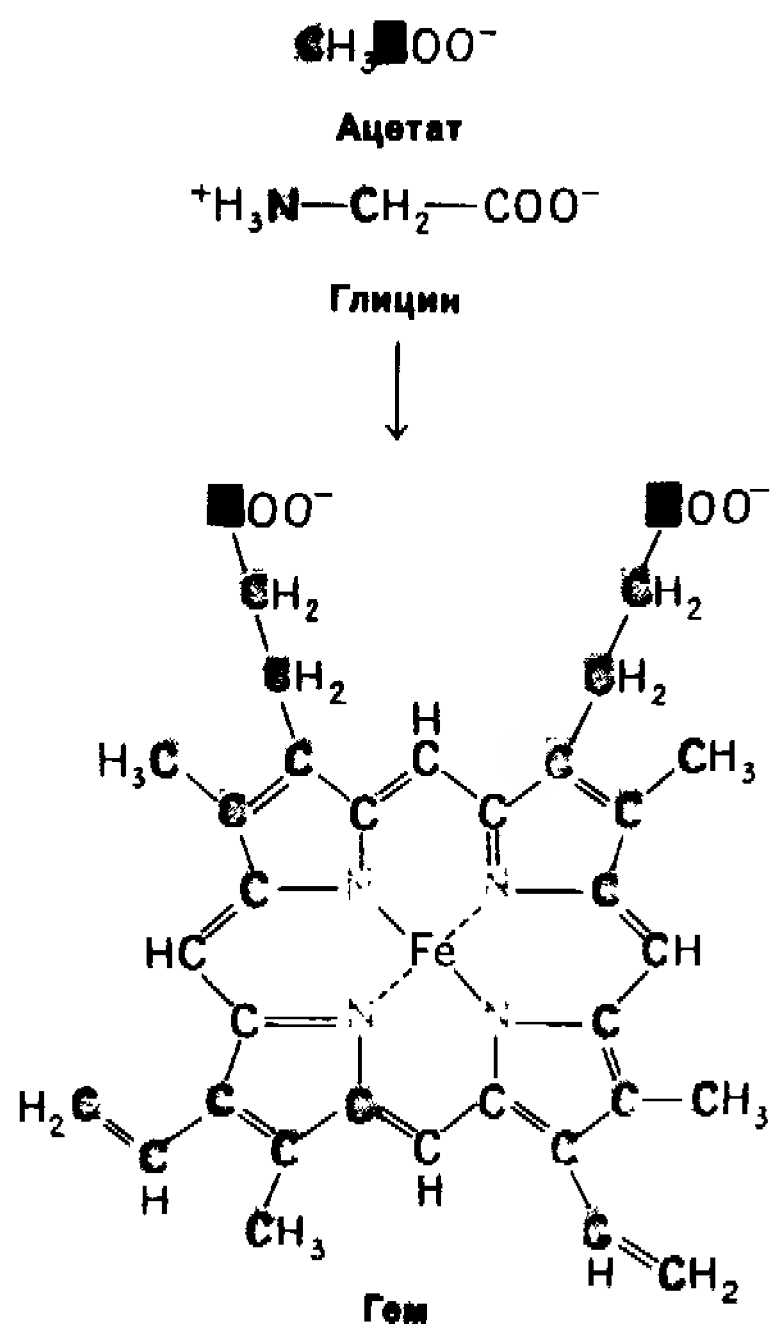
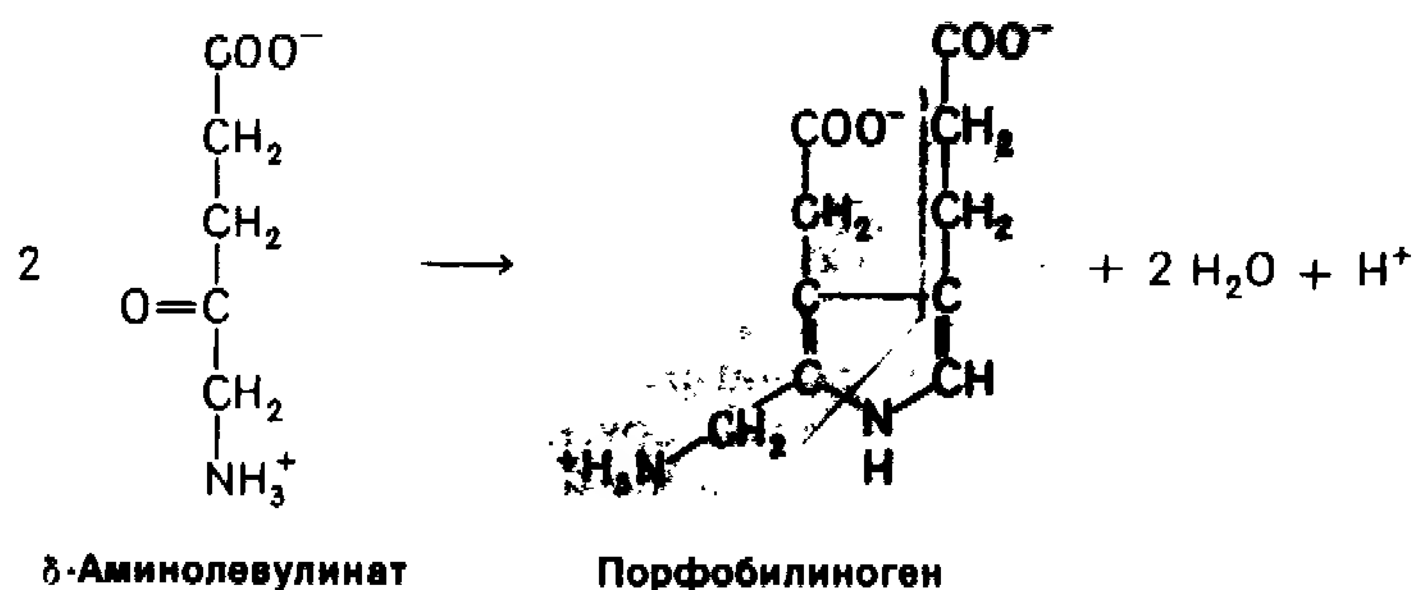


Рис. 21.20. Распределение метки в геме, синтезированном из глицина и ацетата. Атомы азота (показаны синим цветом) происходят из аминогруппы глицина. Атомы углерода имеют следующее происхождение: показанные желтым цветом - из α-углеродного атома глицина, зеленым - в основном из углерода метильной группы ацетата и красные - из карбоксильной группы ацетата.



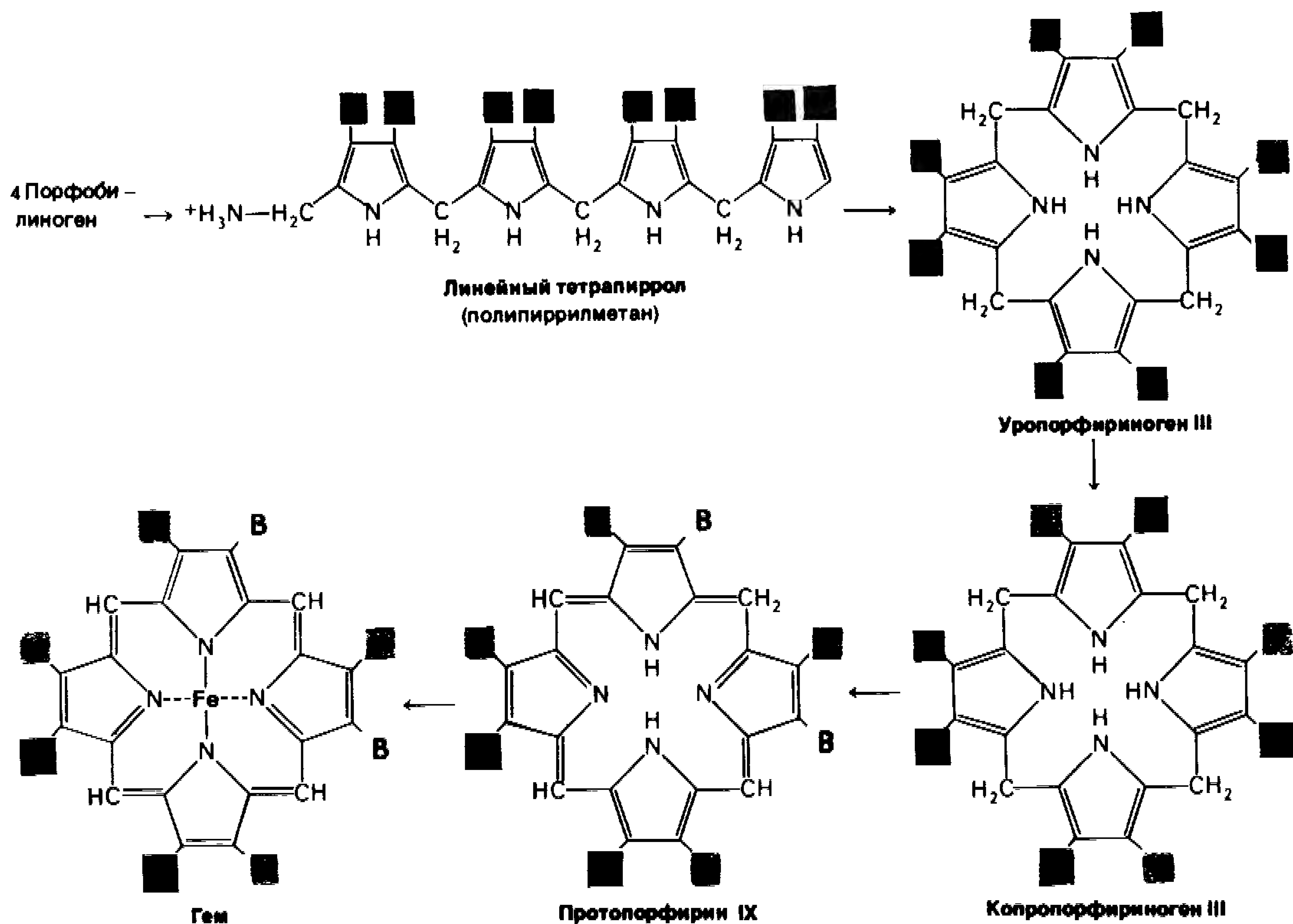


Рис. 21.21. Путь синтеза гема из порфобилиногена. (Сокращения: А – ацетат; М – метил; П – пропионат; В – винил.)

стетическая группа таких белков, как миоглобин, гемоглобин, каталаза, пероксидаза и цитохром *c*. Связывание *ферро*формы железа катализируется *феррохелатазой*. Железо переносится в плазме крови *трансферрином* – белком, связывающим два ферри-иона, и запасается в тканях внутри молекул *ферритина*. Большая внутренняя полость этого белка (диаметр около 80 Å) может содержать до 4500 ферри-ионов.

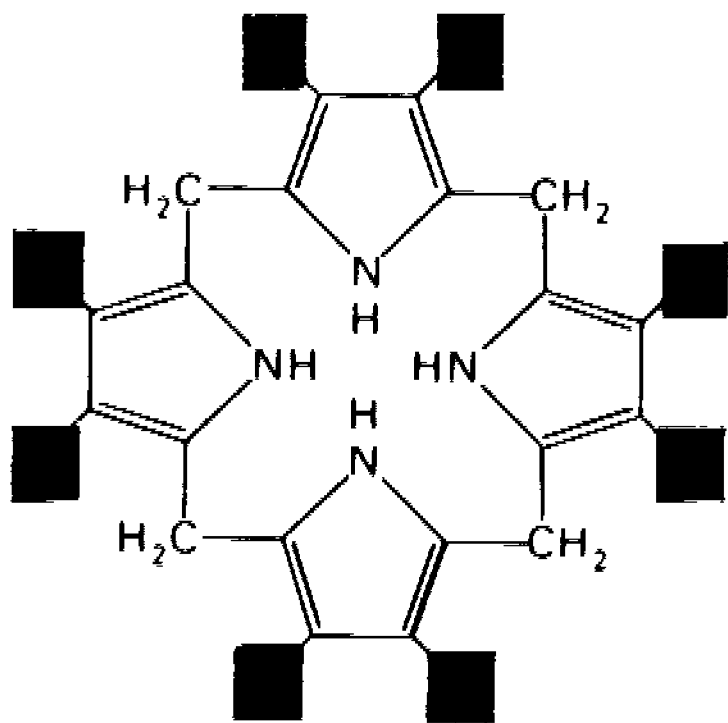
Было выявлено несколько факторов, регулирующих биосинтез гема у животных. *δ-Аминолевулинат-синтаза, фермент, катализирующий первую решающую реакцию этого биосинтетического пути, ингибируется по типу обратной связи гемом*, так же как δ-аминолевулинат-дегидратаза и феррохелатаза. Кроме того, регуляторные механизмы действуют и на уровне синтеза ферментов. *Гем подавляет синтез δ-аминолевулинат-синтазы.* Недавние исследования позволяют предположить, что атом железа сам по себе может быть существенным фактором регуляции.

21.15. При некоторых наследственных нарушениях метаболизма порфиринов происходит их накопление

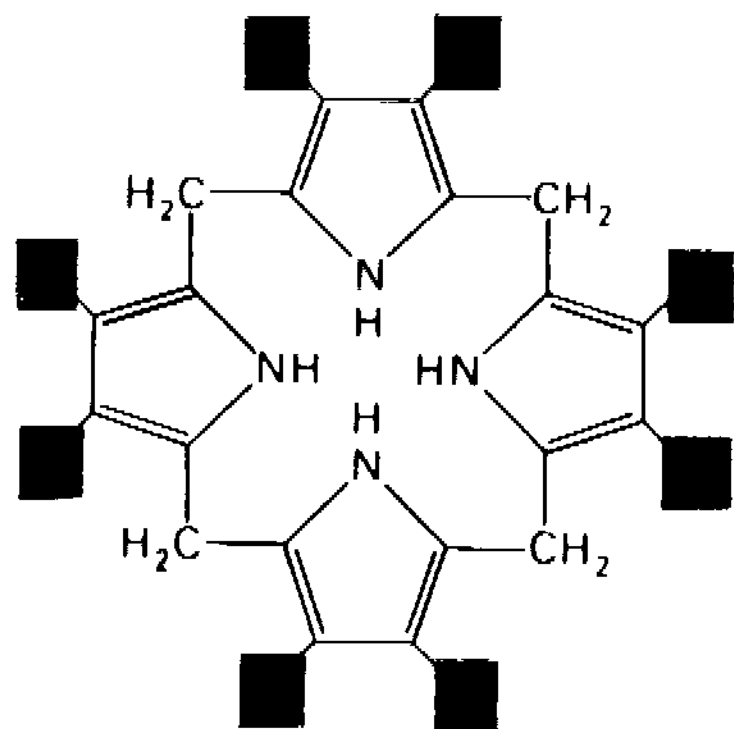
Известно несколько наследственных нарушений метаболизма порфиринов. При *врожденной эритропоэтической порфирии* понижена активность косинтетазы уропорфириногена III, изомеразы, катализирующей образование асимметричного изомера при циклизации линейного тетрапиррола. Для синтеза необходимого количества уропорфириногена III организм вынужден накапливать огромные количества уропорфириногена I, симметричного изомера, лишенного какой-либо физиологической роли. Кроме того, накапливаются уропорфирин I, копропорфирин I и другие симметричные производные. При этом заболевании происходит преждевременное разрушение эритроцитов. Болезнь наследуется как аутосомный рецессивный признак. Моча больных окрашена в красный цвет из-за выделения большого количества уропорфирина I. Зубы

больных флуоресцируют ярко-красным светом в ультрафиолетовом свете из-за отложения порфиринов. Кроме того, их *кожа обычно очень чувствительна к свету.*

Острая перемежающаяся порфирия – заболевание совсем другого характера. Оно поражает не эритроциты, а клетки печени, и кожа больных обычно нечувствительна к свету. Эта болезнь обусловлена снижением активности уропорфириноген-синтазы и сопровождается компенсаторным увеличением активности δ-аминолевулинат-синтазы. Вследствие этого концентрации δ-аминолевулината и порфобилиногена в печени увеличены, и большое количество этих соединений выводится с мочой. Острая перемежающаяся порфирия наследуется как *аутосомный доминантный* признак. Характерные клинические симптомы – перемежающиеся боли в животе и неврологические нарушения. Как показывает название заболевания, клинические проявления носят эпизодический характер. Острые приступы иногда удается подавить с помощью таких лекарств, как барбитураты и эстрогены.



Уропорфириноген I



Уропорфириноген III

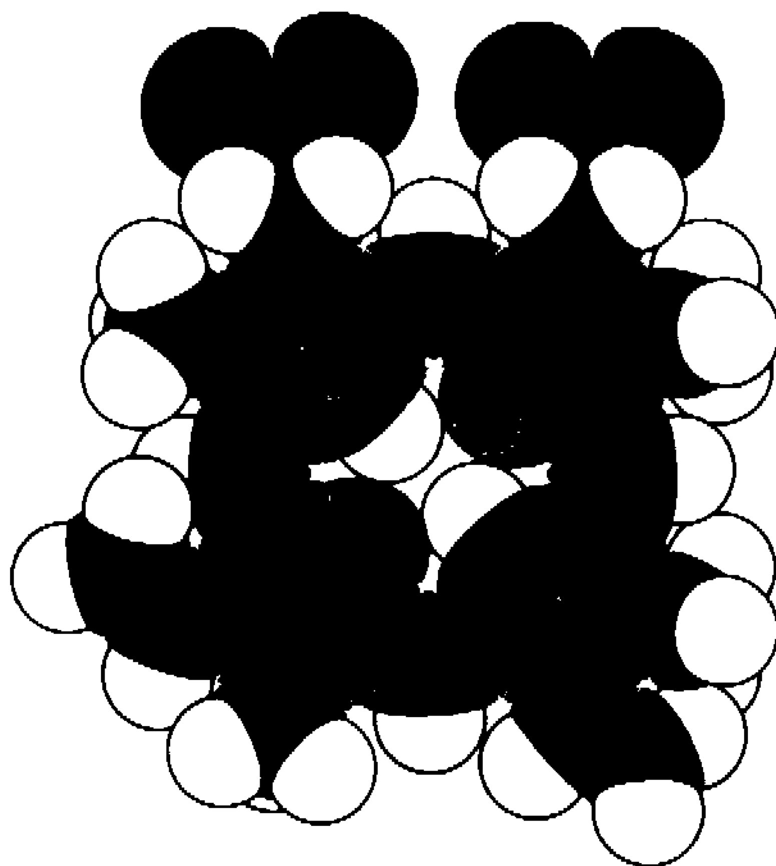


Рис. 21.22. Пространственная модель протопорфирина IX, непосредственного предшественника гема.

21.16. Биливердин и билирубин – промежуточные продукты распада гема

Эритроциты человека в норме живут примерно 120 дней. Старые клетки удаляются из кровеносной системы и распадаются в селезенке. Глобин гидролизуется до составляющих аминокислот. Первая реакция превращения группы гема в билирубин (рис. 21.23) – расщепление α-метенилового мостика с образованием линейного тетрапиррола *биливердина*. Эту реакцию катализирует *гем-оксигеназа*. Следует отметить две особенности этой реакции. Во-первых, фермент, катализирующий эту реакцию, – *монооксигеназа*: для расщепления необходимы O_2 и NADPH. Во-вторых, углерод метенилового мостика высвобождается в виде *оксида углерода*. Этот путь эндогенного образования связан с особой проблемой, касающейся эволюции переносчиков кислорода (разд. 3.7). Затем центральный метениловый мостик биливердина восстанавливается под действием биливердин-редуктазы с образованием *билирубина*. И в этой реакции восстановителем служит NADPH. Изменения цвета синяков – наиболее наглядное проявление этих реакций расщепления.

Билирубин в комплексе с сывороточным альбумином переносится в печень, где он переводится в более растворимое состояние благодаря присоединению остатков сахара к его пропионатным боковым цепям. Эти со-

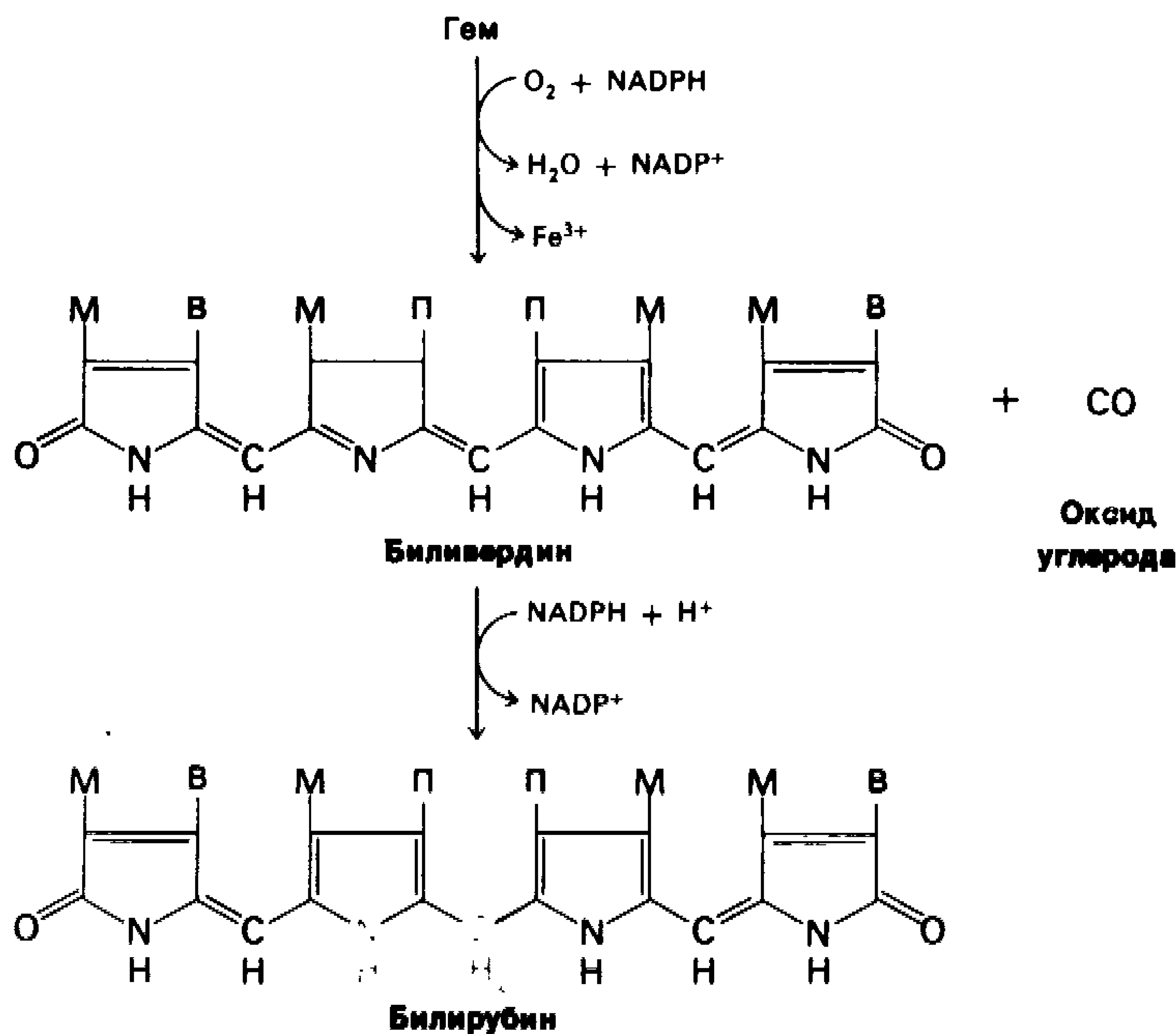
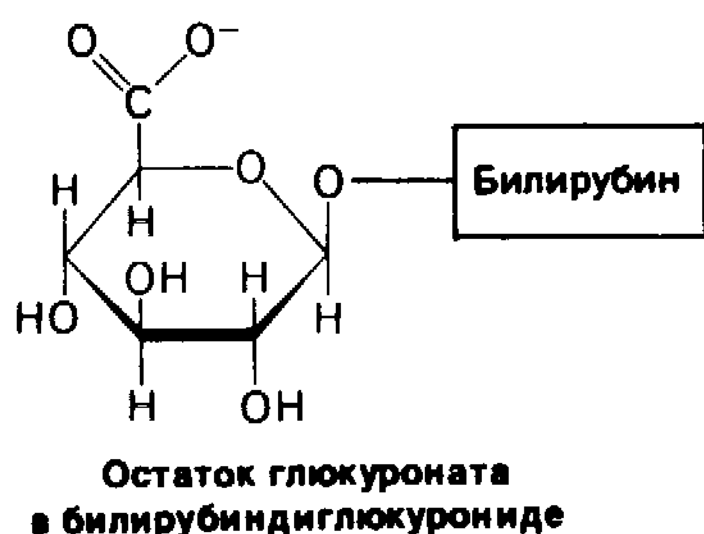


Рис. 21.23. Расщепление гема до билирубина.

любилизирующие остатки сахара представляют собой *глюкуроновую кислоту*, которая отличается от глюкозы тем, что имеет в положении С-6 группу COO^-, а не CH_2OH. Конъюгат билирубина и двух молекул глюкуроната, называемый *диглюкуронидом билирубина*, выделяется с желчью. *UDP-глюкуронат образуется при окислении UDP-глюкозы. Это – активированный промежуточный продукт синтеза диглюкуронида билирубина.* Таким образом, атом железа гема вновь включается в цикл превращений, а органический остаток превращается в растворимую форму с разомкнутой цепью, которая выводится из организма.



Заключение

Микроорганизмы используют АТР и сильный восстановитель для превращения N_2 в NH_4. Затем соли аммония используются высшими организмами для синтеза аминокислот, нуклеотидов и других молекул. Основными соединениями («пунктами входа»), в составе которых NH_4^2 вводится в промежуточный метаболизм, являются глутамин, глутамат и карбамоилфосфат. Организм человека способен синтезировать лишь половину основного набора двадцати аминокислот. Эти аминокислоты называются заменимыми в отличие от незаменимых, которые обязательно должны поступать с пищей. Пути биосинтеза заменимых аминокислот очень просты. Глутамат-дегидрогеназа катализирует восстановительное аминирование α-оксоглутарата с образованием глутамата. Аланин и аспартат синтезируются путем трансаминирования пирувата и оксалоацетата соответственно. Глутамин синтезируется из NH_4^+ и глутамата, сходным образом образуется и аспарагин. Пролин синтезируется из глутамата. Серин, образующийся из 3-фосфоглицерата,– предшественник глицина и цистеина. Тирозин синтезируется путем гидроксилирования незаменимой аминокислоты фенилаланина. Пути биосинтеза незаменимых аминокислот гораздо сложнее, чем заменимых. Эти пути в большинстве своем регулируются путем ингибирования по типу обратной связи, когда решающая реакция аллостерически инги-

бируется конечным продуктом. Регуляция глутамин-синтетазы *E. coli* – наглядный пример кумулятивного ингибирования по типу обратной связи и контроля с помощью каскада обратимых ковалентных модификаций.

Тетрагидрофолят – переносчик активированных одноуглеродных групп; он играет важную роль в метаболизме аминокислот и нуклеотидов. Этот кофермент переносит одноуглеродные фрагменты с различной степенью окисления, которые способны к взаимопревращениям: наиболее восстановленная форма – метильная группа, наиболее окисленные – формильная, формимино- и метенильная группы, группа с промежуточной степенью окисления – метилен. Основной донор активированных метильных групп – S-аденозилметионин, который синтезируется путем переноса аденозильной группы ATP на атом серы метионина. S-аденозилгомоцистеин образуется в результате переноса активированной метильной группы на акцептор. Он распадается на аденозин и гомоцистеин, который затем метилируется с образованием метионина; тем самым завершается цикл активированной метильной группы.

Аминокислоты – предшественники различных молекул. Порфирины синтезируются из глицина и сукцинил-CoA, конденсирующихся с образованием δ-аминолевулината. Молекулы этого промежуточного продукта конденсируются друг с другом, образуя порфобилиноген. Четыре молекулы порфобилиногена соединяются в линейный тетрапиррол, который циклизуется и дает уропорфириноген III. Окисление и модификации боковых цепей приводят к образованию протопорфирина IX, который присоединяет атом железа и становится гемом. δ-Аминолевулинат-синтаза – фермент, катализирующий решающий этап этого биосинтетического пути, ингибируется по типу обратной связи гемом.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Книги

Bender D. A., 1975. *Amino Acid Metabolism, Wiley.*

Meister A., 1965. Biochemistry of the Amino Acids (2nd ed.), vols, 1 and 2, Academic Press. (Подробное описание метаболизма аминокислот, написанное весьма авторитетным специалистом.) [Имеется перевод: Майстер А. Биохимия аминокислот.– М.: ИЛ, 1961]

Prusiner S., Stadtman E. R. (eds.), 1973. The Enzymes of Glutamine Metabolism, Academic Press. (Сборник важнейших статей, касающихся роли глутамина в азотистом обмене.)

Азотфиксация

Mortenson L. E., Thorneley R. N. F., 1979. Structure and function of nitrogenase, Ann. Rev. Biochem., **48**, 387

Hageman R. V., Burris R. H., 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 2699–2702.

Wolff T. E., Berg J. M., Warrick C., Hodgson K. O., Holm R. H., Frankel R. B., 1978. The molybdenum-iron-sulfur cluster comlex $[Mo_2Fe_6S_9(SC_2H_5)_8]^{3-}$: a synthetic approach to the molybdenum site in nitrogenase, J. Am. Chem. Soc., **100**, 4630–4632.

Метаболизм одноуглеродных соединений

Walsh C., 1979. Enzymatic Reaction Metabolisms, Freeman. (Гл. 25 этой книги представляет собой превосходное описание механизмов реакций метаболизма одноуглеродных сое инений.)

Ridley W. P., Dizikes L. J., Wood J. M., 1977. Biomethylation of toxic elements in the environment, Science, **197**, 329–332.

Биосинтез аминокислот и его регуляция

Stadtman E. R., Ginsburg A., 1974. The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 10, pp. 755–807, Academic Press.

Rhee S. G., Park R., Chock P. B., Stadtman E. R., 1978. Allosteric regulation of monocyclic interconvertible enzyme cascade systems: use of *Escherichia coli* glutamine synthetase as an experimental model, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 3138–3142.

Umbarger H. E., 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation, Ann. Rev. Biochem., **47**, 533–606. (Прекрасный обзор биосинтеза аминокислот у бактерий.)

Yanofsky C., Crawford I. P., 1972. Tryptophan synthetase. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 7, pp. 1–31.

Метаболизм железа и гема

Smith K. M. (ed.), 1976. Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier.

Porter R., Fitzsimons D. W. (eds.), 1976. Iron Metabolism. Ciba Foundation Symposium, vol. 51 (New Series), Elsevier.

Maines M. D., Kappas A., 1977. Metals as regulators of heme metabolism, Science, **198**, 1215–1221.

Granick S., Beale S. L., 1978. Hemes, chlorophylls and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation, Advan. Enzymol., **40**, 33–203. (Прекрасная обзорная статья.)

Meyer U. A., Schmid R., 1978. The porphyrias. In: Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1166–1220, McGraw-Hill.

Вопросы и задачи

1. Напишите сбалансированное уравнение синтеза аланина из глюкозы.
2. Через какие промежуточные продукты проходит атом азота от N_2 до гема?
3. Какое производное тетрагидрофолята участвует в каждом из следующих превращений?

а) Глицин → Серин.
б) Гистидин → Глутамат.
в) Гомоцистеин → Метионин.

4. В реакции, катализируемой глутамин-синтетазой, атом кислорода переносится с боковой цепи глутамата на ортофосфат, как показано в исследованиях с применением меченого кислорода ^{18}O. Предложите объяснение этого экспериментального факта.
5. Изовалериановая ацидемия — наследственное нарушение метаболизма лейцина, обусловленное недостаточностью изовалерил-CoA — дегидрогеназы. Многие дети, страдающие этим заболеванием, погибают в течение первого месяца жизни. Недавно появилось сообщение, что введение большого количества глицина двум больным детям привело к существенному улучшению клинической картины. На чем основано лечение этого нарушения глицином?
6. Нитрогеназа катализирует образование HD в присутствии D_2, сильного восстановителя и ATP. Кроме того, обмен H — D зависит от присутствия N_2. Образованием каких промежуточных продуктов фиксации N_2 можно по-вашему объяснить эти наблюдения?
7. В отсутствие солей аммония или нитратов сине-зеленые водоросли образуют *гетероцисты*. В гетероцистах нет ядер, и они прикрепляются к соседним вегетативным клеткам. Гетероцисты содержат активную фотосистему I, но полностью лишены фотосистемы II. Какова роль гетероцист?

ГЛАВА 22

Биосинтез нуклеотидов

Данная глава посвящена биосинтезу нуклеотидов. Эти соединения участвуют почти во всех биохимических процессах.

1. Они являются *активированными предшественниками ДНК и РНК.*

2. Производные нуклеотидов – *активированные промежуточные продукты многих биосинтетических реакций.* Например, UDP-глюкоза и CDP-диацилглицеролы – предшественники гликогена и фосфоацилглицеролов (фосфоглицеридов) соответственно.

3. Адениннуклеотид АТР – *универсальная энергетическая валюта* в биологических системах.

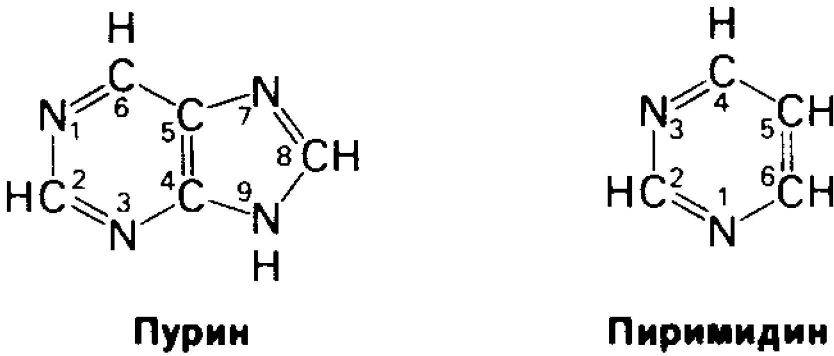
4. Адениннуклеотиды – *компоненты трех основных коферментов*: NAD^+, FAD и CoA.

5. Нуклеотиды являются *регуляторами метаболизма.* Циклический AMP – универсальный посредник действия многих гормонов, встречающийся повсеместно. Ковалентные модификации, производимые молекулами АТР, изменяют активность некоторых ферментов; в качестве примера можно назвать фосфорилирование гликоген-синтезы и аденилирование глутаминсинтетазы.

22.1. Номенклатура оснований, нуклеозидов и нуклеотидов

Нуклеотид состоит из азотистого основания, остатка сахара и одной или нескольких фосфатных групп. Азотистое основание – производное *пурина* или *пиримидина.* Два основных пурина – *аденин* и *гуанин,* а три основных пиримидина – *цитозин, урацил* и *тимин* (рис. 22.1).

Нуклеозид состоит из пуринового или пиримидинового основания, соединенного с пентозой. Пентоза – это *D-рибоза* или *β-D-дезокси-2-рибоза.* В нуклеозиде гликозидный атом углерода пентозы С-1 связан с N-1 пиримидинового или N-9 пуринового основания. Во всех нуклеозидах, встречающихся в живых клетках, эта N-гликозидная связь находится в β-конфигурации.



Пентоза в рибонуклеозидах – рибоза, а в дезоксинуклеозидах – дезоксирибоза. Основные рибонуклеозиды – *аденозин, гуанозин, уридин* и *цитидин.* Основные дезоксирибонуклеозиды – *дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезокситимидин* и *дезоксицитидин.* Обратите внимание, что в дезоксисоединениях вместо урацила присутствует его метилированный аналог тимин.

Нуклеотид – фосфорный эфир нуклеозида. В нуклеотиде хотя бы одна гидроксильная группа пентозы этерифицирована. Чаще всего этерифицирована гидроксильная группа при С-5 пентозы. Такое соединение назы-

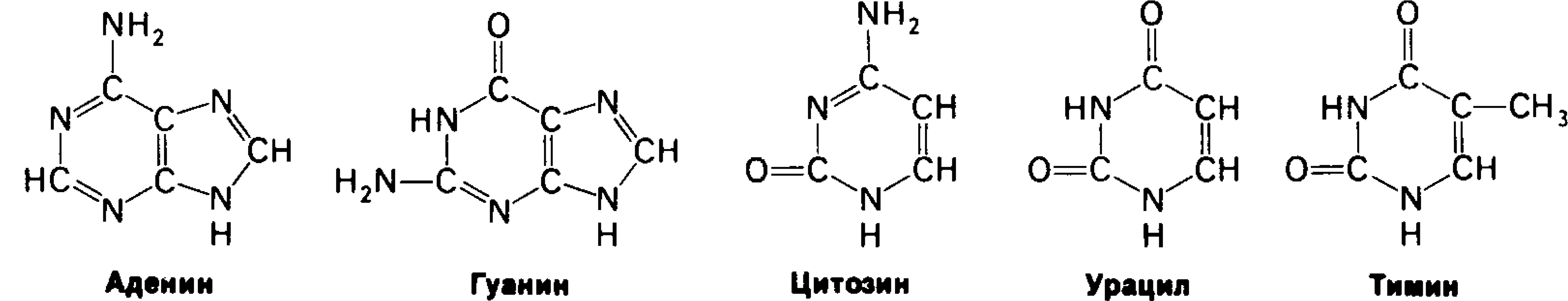


Рис. 22.1. Строение основных пуринов и пиримидинов.

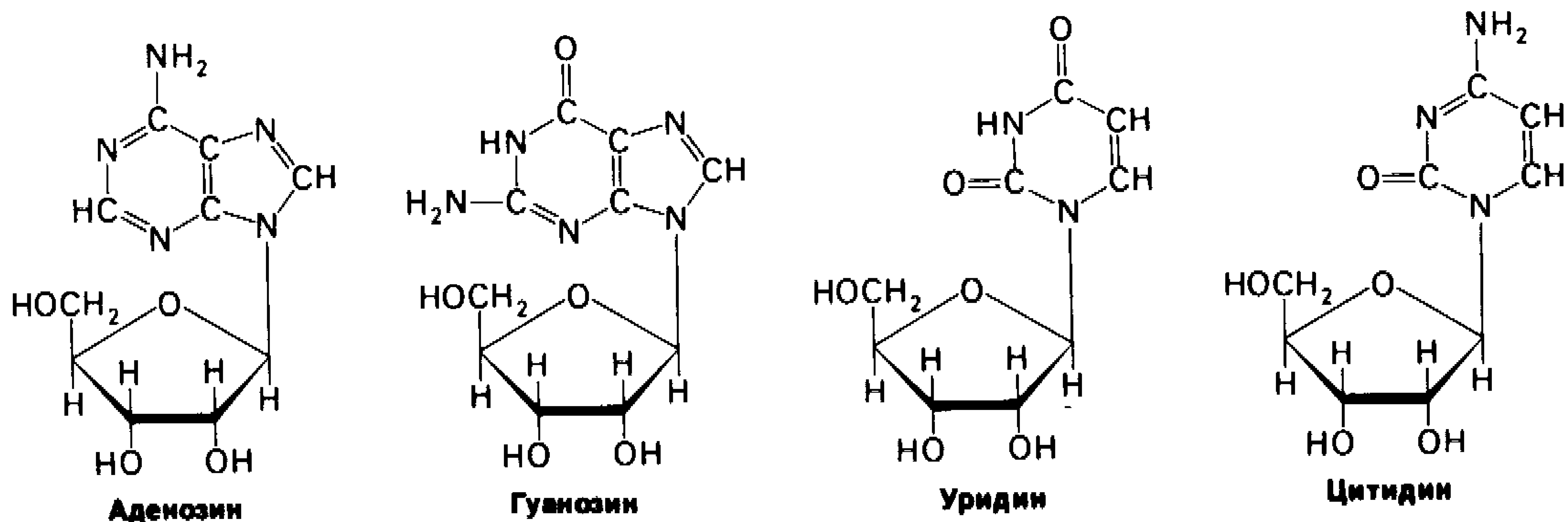


Рис. 22.2. Строение основных рибонуклеозидов.

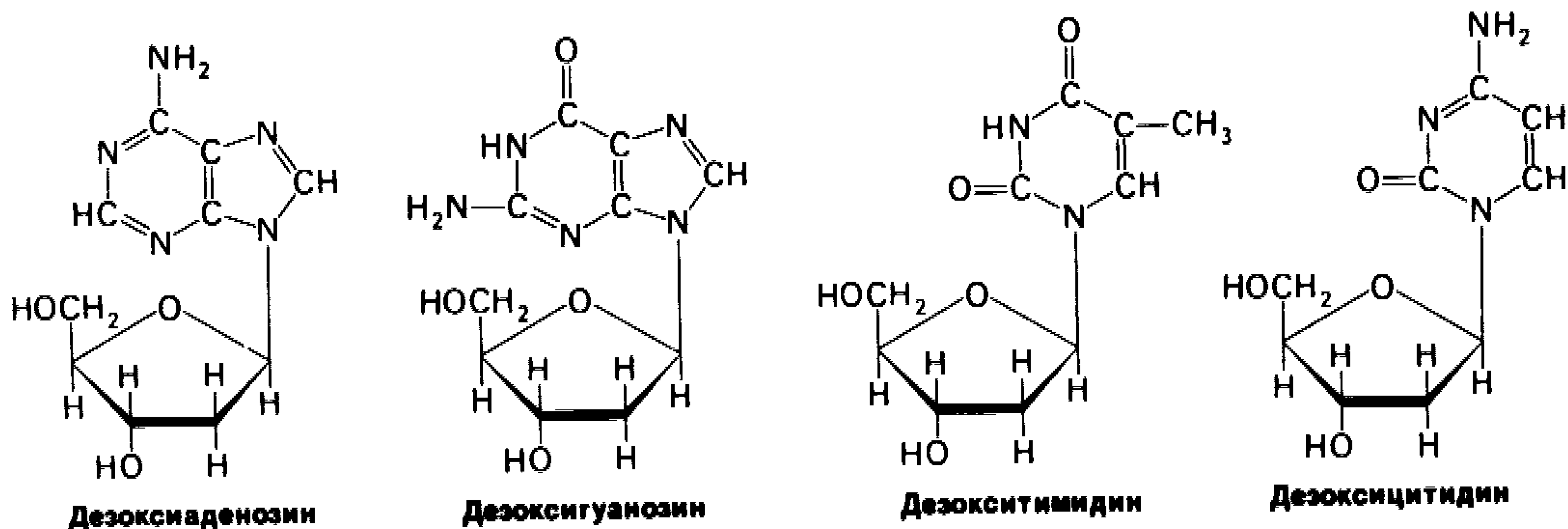
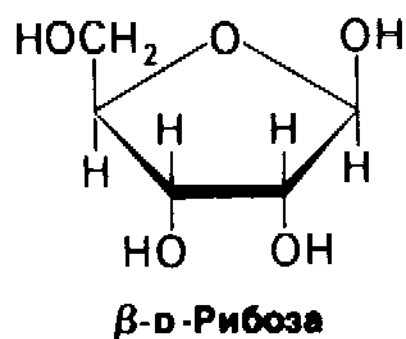
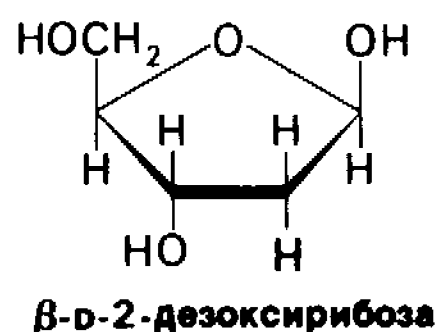


Рис. 22.3. Строение основных дезоксирибонуклеозидов.

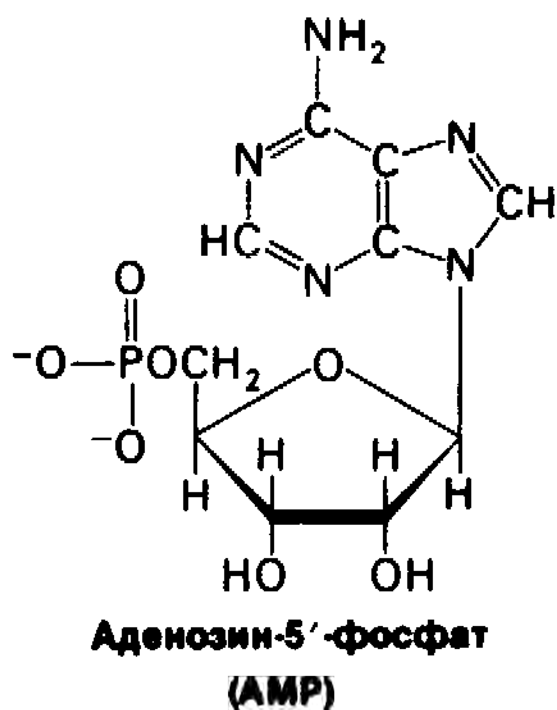
вается *нуклеозид-5'-фосфатом*, или *5'-нуклеотидом*. Цифрами со штрихом отмечаются атомы пентозы, цифрами без штриха – атомы пуринового или пиримидинового кольца. Тип пентозы обозначается приставкой в названии (*5'-рибонуклеотид* или *5'-дезоксирибонуклеотид*).

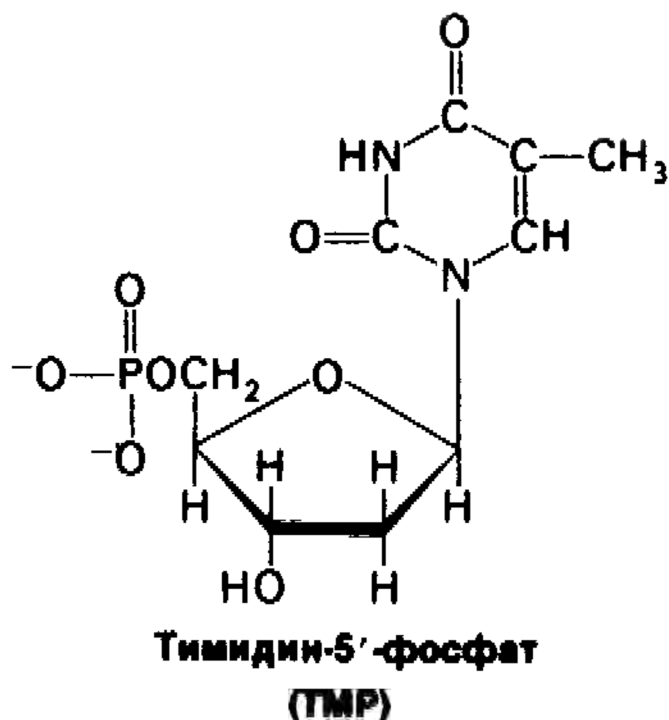
Нуклеотид, образующийся при этерификации 5'-гидроксильной группы аденозина,– это *аденозин-5'-фосфат*, который часто называют *аденилатом*. Иногда используют термин «адениловая кислота», но лучше называть это соединение аденилатом, так как при физиологических значениях pH фосфатная группа ионизирована. Стандартное сокращенное наименование этого соединения – AMP (для аденозинмонофосфата). Обычные названия других основных 5'-рибонуклеотидов – *гуанилат* (GMP), *уридилат* (UMP) и *цитидилат* (CMP). Основные 5'-дезоксирибонуклеотиды называются *дезоксиаденилат* (dAMP), *дезоксигуанилат* (dGMP), *дезокситимидилат* (dTMP) и *дезоксицитидилат* (dCMP). Первая буква *d* в этих сокращениях означает, что они относятся к 2'-дезоксирибонуклеотидам.





В *нуклеозид-5'-дифосфате* к 5'-гидроксилу пентозы присоединена эфирной связью дифосфатная группа, а в *нуклеозид-5'-трифосфате* к этому гидроксилу присоединена трифосфатная группа. Таким образом, ряд адениновых рибонуклеотидов составляют следующие соединения: аденозин-5'-монофосфат (AMP), аденозин-5'-дифосфат (ADP) и аденозин-5'-трифосфат (ATP). Соответствующие дезоксирибонуклеотиды – дезоксиаденозин-5'-монофосфат (dAMP), дезоксиаденозин-5'-дифосфат (dADP) и дезоксиа-





денозин-5′-трифосфат (dATP). Номенклатура оснований, нуклеозидов и нуклеотидов суммирована в табл. 22.1.

Таблица 22.1. **Номенклатура азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов**

Азотистое основание	Рибонуклеозид	Рибонуклеотид (5′-монофосфат)
Аденин (A)	Аденозин	Аденилат (AMP)
Гуанин (G)	Гуанозин	Гуанилат (GMP)
Урацил (U)	Уридин	Уридилат (UMP)
Цитозин (C)	Цитидин	Цитидилат (CMP)
Азотистое основание	**Дезоксирибонуклеозид**	**Дезоксирибонуклеотид (5′-монофосфат)**
Аденин (A)	Дезоксиаденозин	Дезоксиаденилат (dAMP)
Гуанин (G)	Дезоксигуанозин	Дезоксигуанилат (dGMP)
Тимин (T)	Дезокситимидин	Дезокситимидилат (dTMP)
Цитозин (C)	Дезоксицитидин	Дезоксицитидилат (dCMP)

22.2. Пуриновое кольцо синтезируется из аминокислот, производных тетрагидрофолята и CO_2

Пуриновое кольцо пуриновых нуклеотидов собирается из различных предшественников (рис. 22.4). *Глицин* дает атомы С-4, С-5 и N-7. Атом N-1 происходит из *аспартата*. Еще два атома азота, N-3 и N-9, происходят из амидогруппы боковой цепи *глутамина*. Активированные производные *тетрагидрофолята* поставляют С-2 и С-8, тогда как CO_2 служат источником С-6.

22.3. Фосфорибозилпирофосфат – донор рибозофосфатного остатка нуклеотидов

Путь биосинтеза пуринов был расшифрован в 50-х годах в работах Джона Бьюкенена, Дж. Роберта Гринберга и др. (John Buchanan,

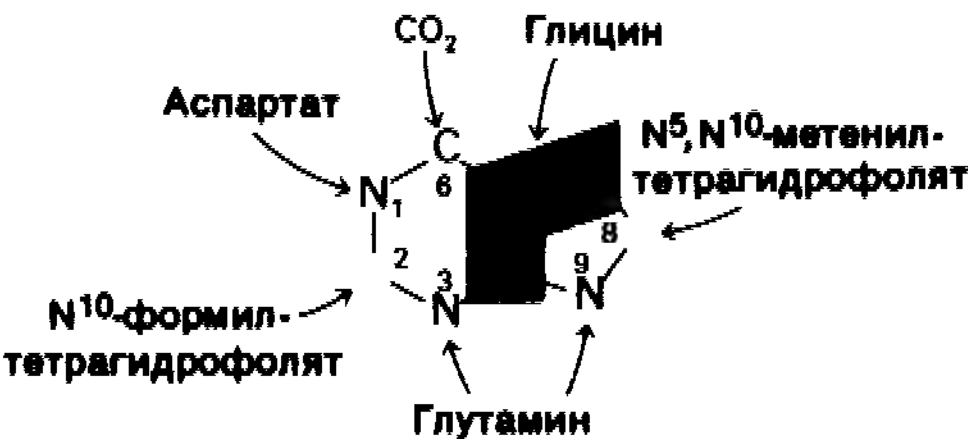
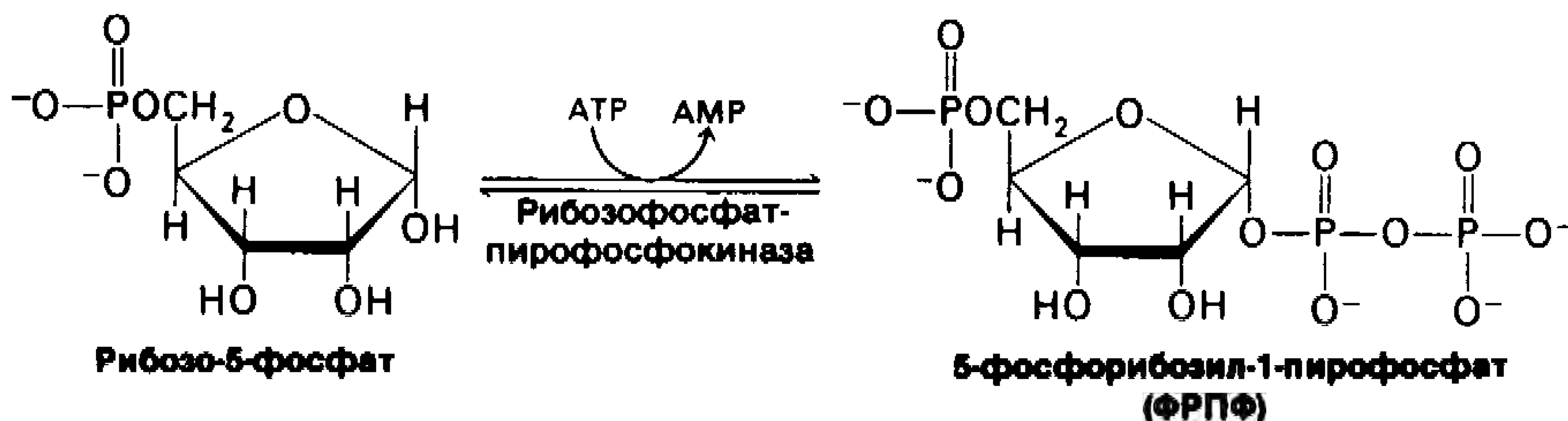


Рис. 22.4. Происхождение атомов пуринового кольца.



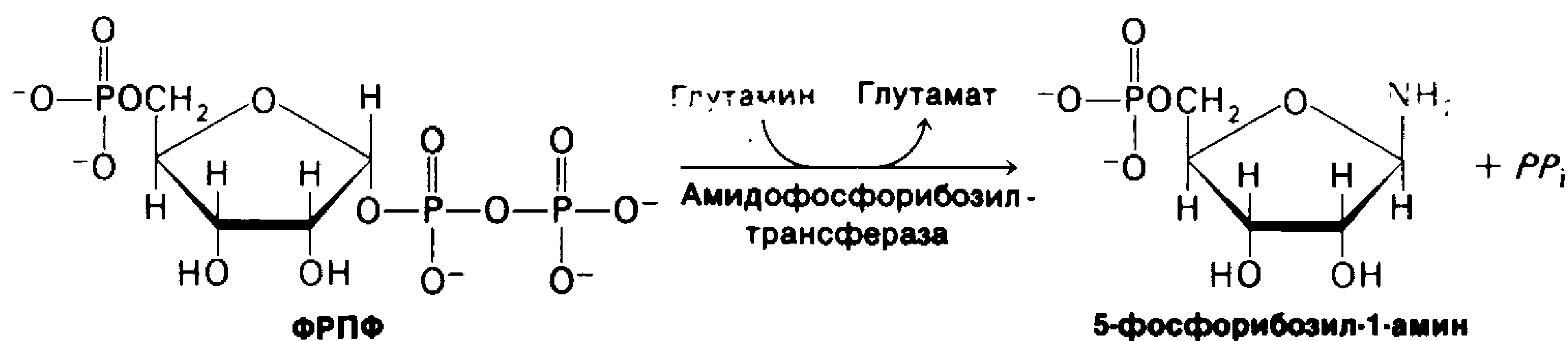




Рис. 22.5. Пространственная модель 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ), активированного донора остатка сахара при биосинтезе нуклеотидов.

G. Robert Greenberg). Рибозофосфатный остаток пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов происходит из *5-фосфорибозил-1-пирофосфата* (ФРПФ), ключевого промежуточного продукта биосинтеза гистидина и триптофана. ФРПФ синтезируется из АТР и рибозо-5'-фосфата, который в свою очередь образуется в реакциях пентозофосфатного пути (разд. 15.1). Пирофосфатная группа переносится с АТР на С-1 рибозо-5-фосфата. ФРПФ находится в α-конфигурации.

22.4. Пуриновое кольцо присоединяется к рибозофосфату во время его сборки

Первый решающий этап синтеза пуриновых нуклеотидов de novo – образование *5-фосфорибозиламина* из ФРПФ и глутамина. Аминогруппа боковой цепи глутамина замещает пирофосфатную группу, присоединенную к С-1 ФРПФ. В ходе этой реакции α-конфигурация атома С-1 переходит в β-конфигурацию. Образующаяся гликозидная связь C—N имеет β-конфигурацию, характерную для природных нуклеотидов. Движущая сила этой реакции – гидролиз пирофосфата.

Продукт присоединения глицина к фосфорибозиламину – *рибонуклеотид глицинамида* (рис. 22.6). На образование амидной связи между карбоксильной группой глицина и аминогруппой фосфорибозиламина затрачивается одна молекула АТР. Затем α-аминогруппа остатка глицина формилируется метенилтетрагидрофолятом, образуя *рибонуклеотид α-N-формилглицинамида.*

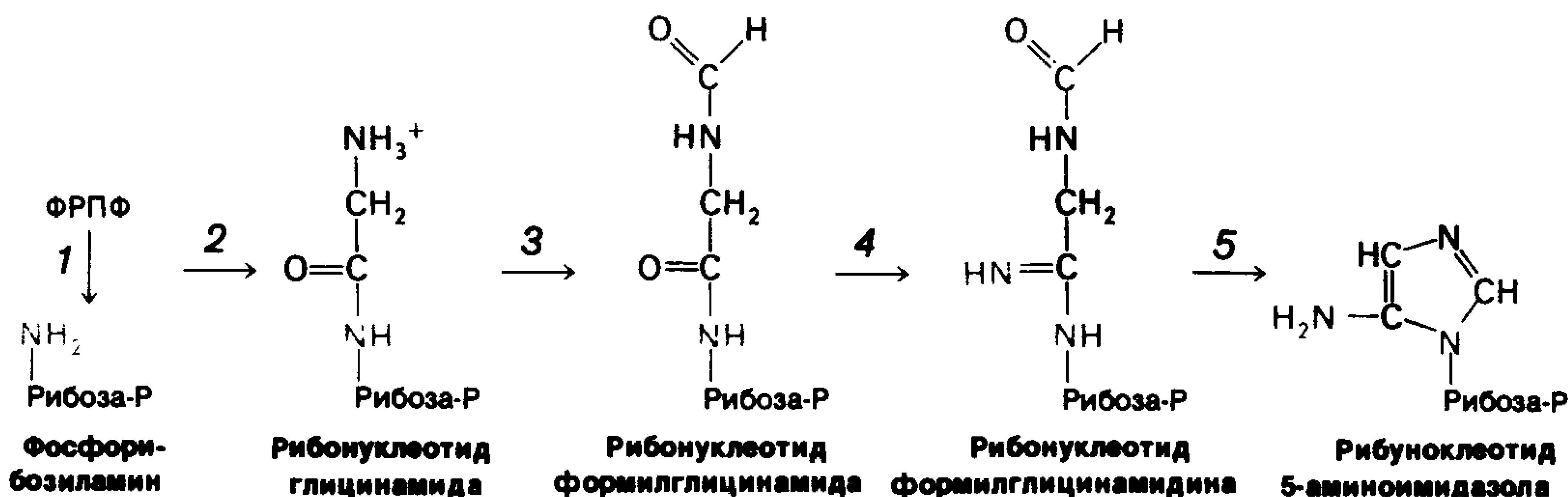


Рис. 22.6. Первый этап биосинтеза пуринов: образование 5-аминоимидазолрибонуклеотида из ФРПФ. Смысл этих реакций заключается в замещении пирофосфатной группы аминогруппой боковой цепи глутамина (*1*), присоединении глицина (*2*), формилировании с участием метенилтетрагидрофолята (*3*), переносе атома азота глутамина (*4*), дегидратировании и замыкании кольца (*5*).

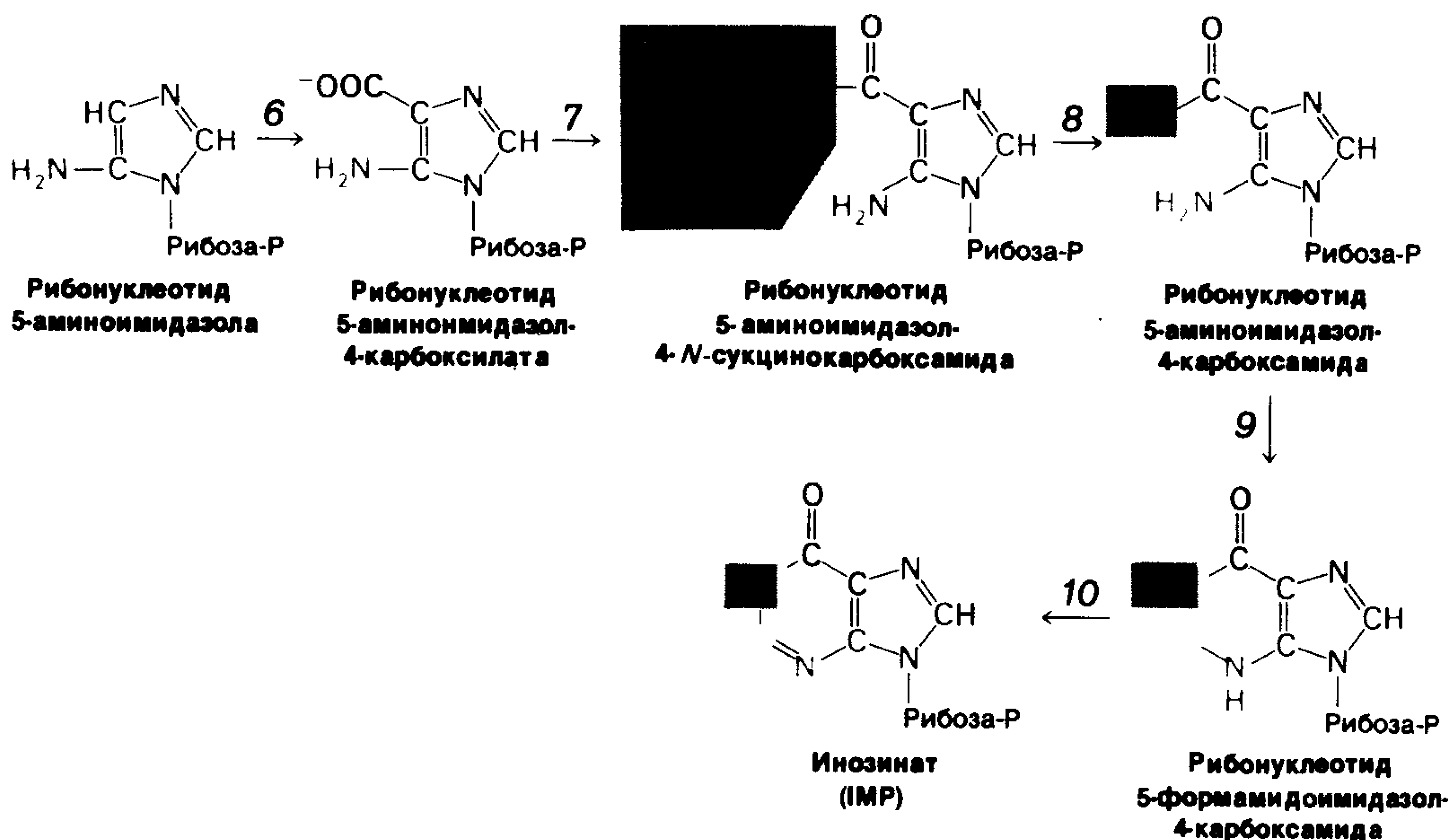


Рис. 22.7. Второй этап биосинтеза пуринов: образование инозината из 5-аминоимидазолрибонуклеотида. Суть этих реакций – карбоксилирование (*6*), присоединение аспартата (*7*), отщепление фумарата (в результате которого остается аминогруппа аспартата) (*8*), формилирование с использованием N^{10}-формилтетрагидрофолята (*9*), дегидратация и замыкание кольца (*10*).

Амидная группа этого соединения превращается в амидиновую группу. Атом азота происходит из боковой цепи глутамина; в этой реакции затрачивается одна молекула ATP. *Рибонуклеотид формилглицинамидина вступает затем в реакцию замыкания кольца с образованием рибонуклеотида 5-аминоимидазола.* Этот промежуточный продукт содержит полное пятичленное кольцо пуринового остова.

Теперь начинается следующий этап синтеза скелета пурина – образование шестичленного кольца (рис. 22.7). Три из шести атомов этого кольца уже присутствуют в рибонуклеотиде аминоимидазола. Три другие атома происходят из CO_2, аспартата и формилтетрагидрофолята. Следующий атом углерода шестичленного кольца вводится путем карбоксилирования рибонуклеотида аминоимидазола, приводящим к образованию *рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-карбоновой кислоты.*

Затем аминогруппа аспартата реагирует с карбоксильной группой этого промежуточного продукта с образованием *рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-N-сукцинокарбоксамида.* На образование этой амидной связи затрачивается молекула ATP. В следующей реакции углеродный скелет остатка аспартата отщепляется в виде фумарата, и образуется рибонуклеотид *5-аминоимидазол-4-карбоксамида.* Следует отметить, что в результате этих двух реакций карбоксилат превращается в амид. Таким образом, из *аспартата в пуриновое кольцо включается только атом азота.* Последний атом пуринового кольца происходит из N^{10}-формилтетрагидрофолята. В результате образуется *рибонуклеотид 5-формамидоимидазол-4-карбоксамида.*; он претерпевает дегидратацию и замыкание кольца, давая *инозинат* (IMP), содержащий полный пуриновый скелет. Пуриновое основание, входящее в состав инозината, называется *гипоксантин.*

22.5. AMP и GMP образуются из IMP

Инозинат (инозинмонофосфат, IMP) – предшественник AMP и GMP (рис. 22.8). *Аденилат* синтезируется из инозината путем введения аминогруппы по C-6 положению вместо карбонильного кислорода. Амино-

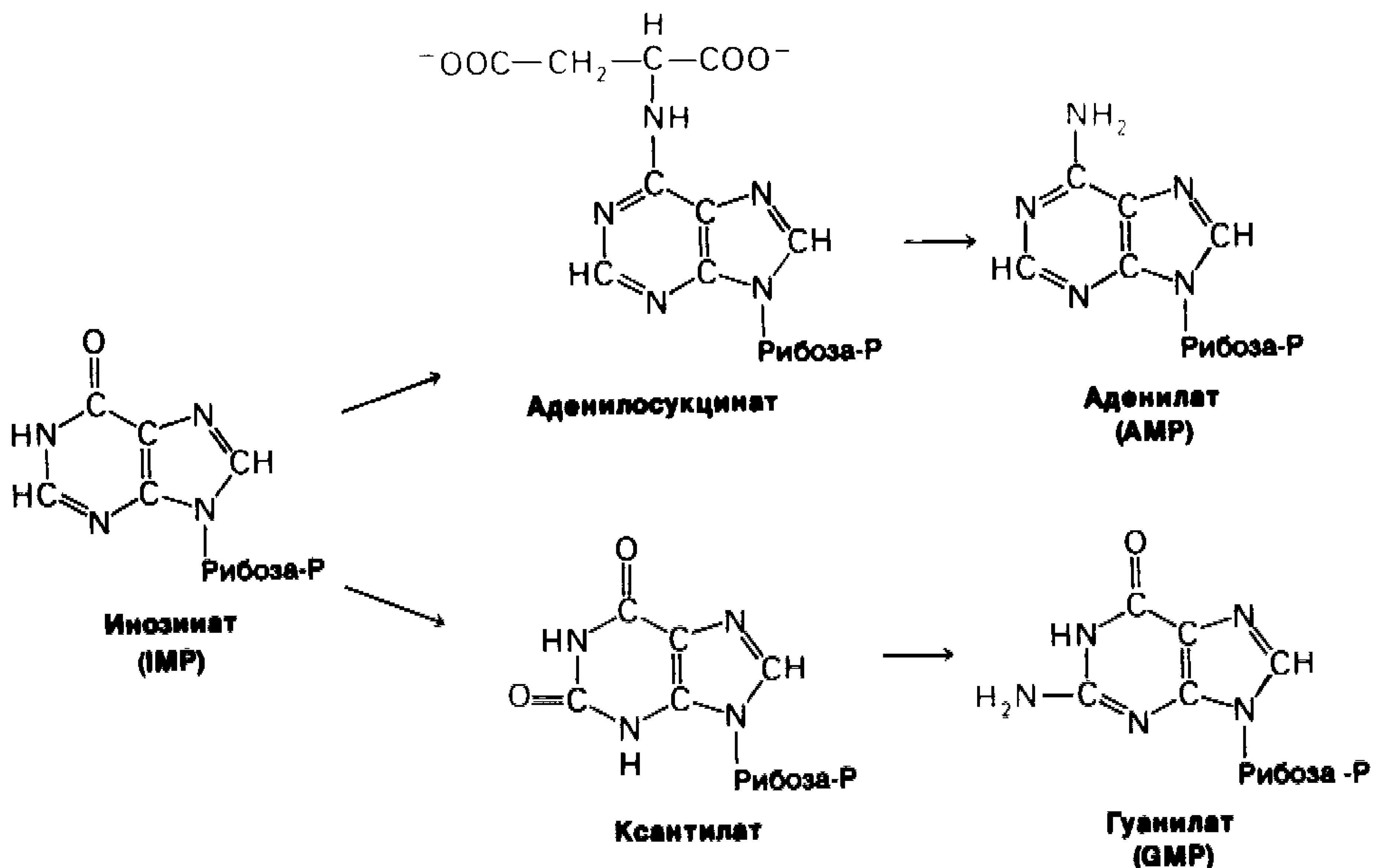


Рис. 22.8. AMP и GMP синтезируются из IMP.

группу поставляет аспартат путем присоединения этой аминокислоты к рибонуклеотиду и последующего удаления фумарата. GTP – донор высокоэнергетической фосфатной связи при синтезе *аденилосукцината* из инозита и аспартата. Отщепление фумарата от аденилосукцината и от рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-N-сукцинокарбоксамида катализируется одним и тем же ферментом.

Гуанилат (инозинмонофосфат, GMP) синтезируется путем окисления инозината и последующего введения аминогруппы в положение С-2. NAD^+ – акцептор водорода при окислении инозината до ксантилата (ксантинмонофосфата, XMP). Затем аминогруппа боковой цепи глутамина переносится на ксантилат. В этой реакции тратятся две высокоэнергетические связи, так как ATP расщепляется на AMP и PP_i, который затем гидролизуется.

При превращении инозината в аденилат и гуанилат карбонильный атом кислорода замещается аминогруппой. Сходное замещение происходит при синтезе рибонуклеотида формилглицинамида из соответствующего амидного предшественника (реакция *4* на рис. 22.6) при образовании CTP из UTP (разд. 22.13) и при превращении цитруллина в аргинин в цикле мочевины (разд. 18.5). *Общий принцип этих реакций заключается в том, что карбонильный кислород превращается в какое-то производное, которое легко может вступить в реакцию замещения аминогруппой.* Таутомерная форма карбонильной группы реагирует с ATP (или с GTP) и образует фосфорный эфир, который атакуется нуклеофильным амином (рис. 22.9). Затем неорганический фосфат отщепляется от тетраэдрического переходного комплекса и реакция завершается. В качестве атакующего амина может выступать NH_3, амидная группа боковой цепи глутамина или α-аминогруппа аспартата. На промежуточной стадии реак-

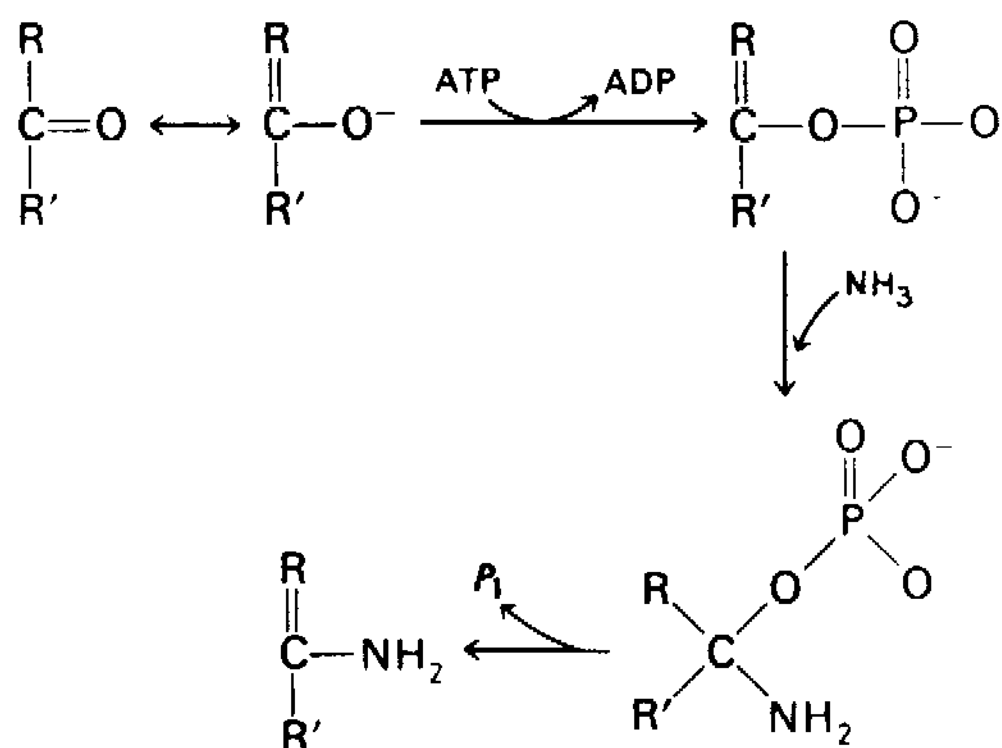


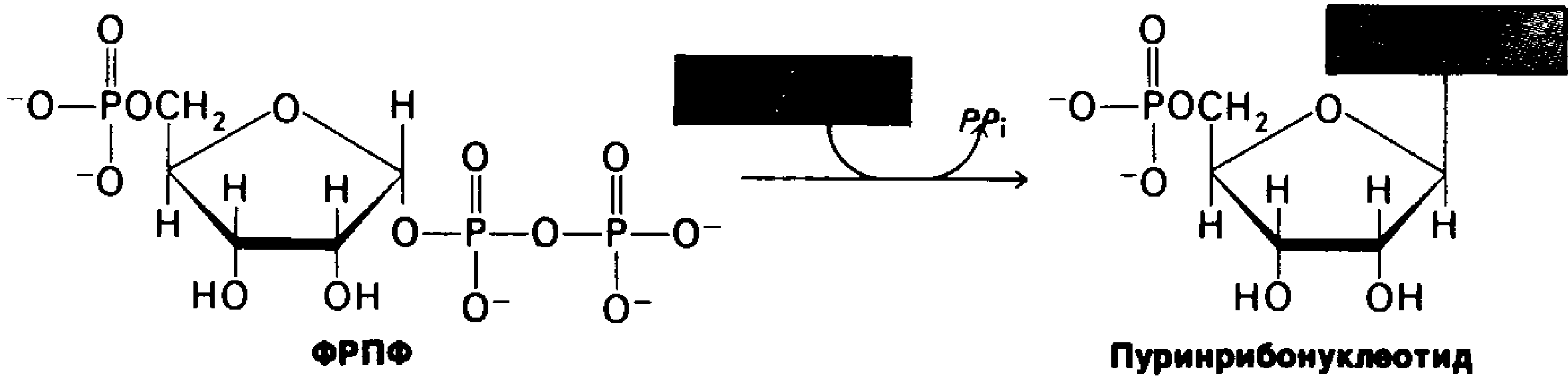
Рис. 22.9. Механизм реакции замещения карбонильного кислорода аминогруппой.

ций этого типа отщепляется фосфат, пирофосфат или остаток AMP. Например, при синтезе 5-фосфорибозил-1-амина из ФРПФ аминогруппа глутамина замещает пирофосфат (разд. 22.4).

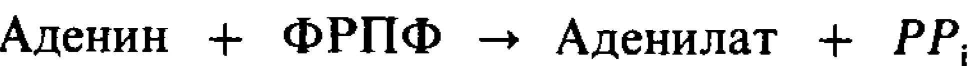
22.6. Пуриновые основания могут использоваться повторно с помощью реакций синтеза из готовых остатков с участием ФРПФ

Свободные пуриновые основания образуются путем гидролитического расщепления нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Пуриннуклеотиды могут синтезироваться из таких предобразованных оснований с помощью *реакций синтеза из готовых остатков*. Эти реакции проще, чем *пути синтеза de novo*, обсуждавшиеся выше, и обходятся клетке гораздо дешевле. При синтезе из готовых остатков рибозофосфатная группа ФРПФ переносится на пурин и образуется соответствующий нуклеотид.

Существуют два фермента, участвующие

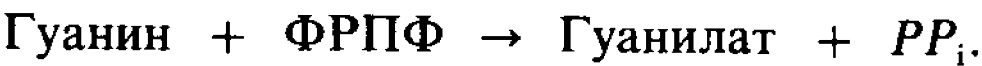


в реакциях синтеза из готовых остатков, с различной специфичностью. *Аденин-фосфорибозилтрансфераза* катализирует образование аденилата:


Аденин + ФРПФ → Аденилат + PP_i

Гипоксантин-гуанин – фосфорибозилтрансфераза катализирует образование инозината и гуанилата:


Гипоксантин + ФРПФ → Инозинат + + PP_i,


Гуанин + ФРПФ → Гуанилат + PP_i.

Многообразие и эффективность путей использования пуринов можно продемонстрировать также на примере биосинтеза гистидина. Шестичленный фрагмент пуринового кольца ATP участвует в построении имидазольного кольца гистидина (разд. 21.10). Остаток пуринового скелета тоже не пропадает впустую: он сохраняется в виде рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-карбоксамида, промежуточного продукта биосинтеза de novo пуринового кольца.

22.7. AMP и GMP – ретроингибиторы биосинтеза пуриновых нуклеотидов

Синтез пуриновых нуклеотидов регулируется ингибированием по принципу обратной связи на нескольких стадиях (рис. 22.10).

1. Концентрация ФРПФ регулируется ингибированием *5-фосфорибозил-1-пирофосфат — синтетазы* пуриннуклеотидами. Эта синтетаза ингибируется AMP, GMP и IMP.

2. Решающий этап биосинтеза пуриновых нуклеотидов – превращение ФРПФ в фосфорибозиламин путем переноса ами-

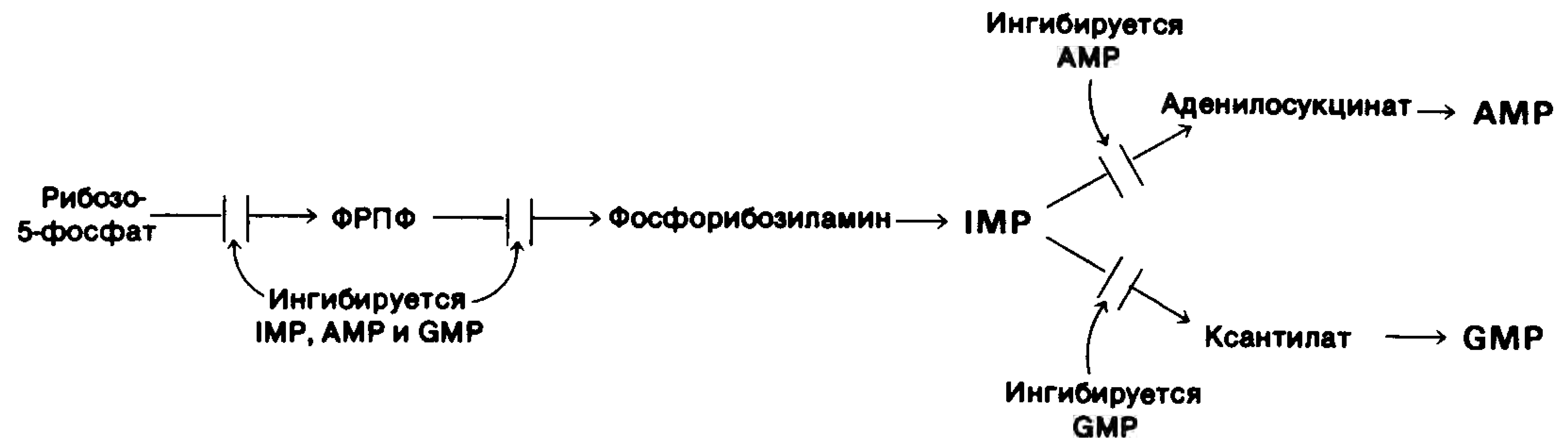
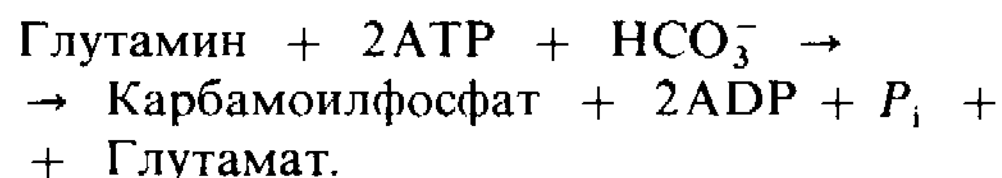


Рис. 22.10. Регуляция биосинтеза пуринов.

ногруппы боковой цепи глутамина. *Глутамин-фосфорибозилпирофосфат — амидотрансфераза ингибируется многими пуриновыми рибонуклеотидами* по механизму обратной связи. Следует отметить, что ингибирующее действие AMP и GMP на этот фермент синергично.

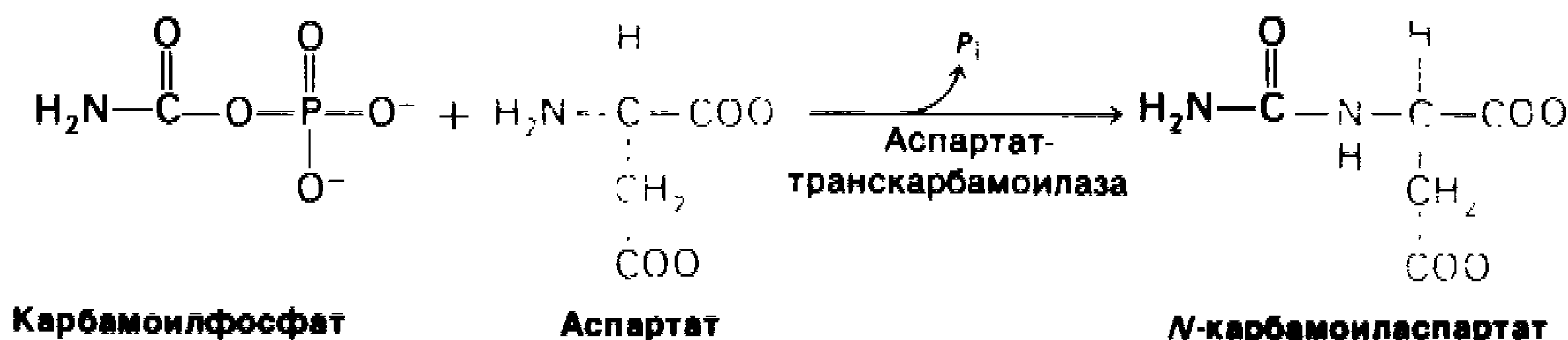
3. Образование инозината – точка разветвления путей синтеза AMP и GMP. *Реакции, ведущие от инозината к синтезу AMP и GMP, ингибируются по механизму обратной связи.* AMP подавляет превращение инозината в аденилосукцинат, его непосредственный предшественник. Подобно

моилфосфат, используемый для синтеза мочевины,– в митохондриях (разд. 18.5). Существуют две разные карбамоилфосфат-синтазы. Еще одно существенное различие состоит в том, что при синтезе карбамоилфосфата в цитозоле донором азота служит глутамин, а не NH_4^+:



$$\text{Глутамин} + 2ATP + HCO_3^- \rightarrow \text{Карбамоилфосфат} + 2ADP + P_i + \text{Глутамат}.$$

Решающий этап в биосинтезе пиримидинов – образование N-карбамоиласпартата из аспартата и карбамоилфосфата. Карбамои-



этому, GMP ингибирует превращение инозината в ксантилат – непосредственный предшественник GMP.

4. GTP служит субстратом для синтеза AMP, а ATP – субстрат для синтеза GMP. Эта *взаимосвязь на уровне субстратов* необходима для того, чтобы сбалансировать синтез адениловых и гуаниловых рибонуклеотидов.

лирование катализируется *аспартат-транскарбамоилазой* (*аспартат-карбамоилтрансферазой, АТКазой*), ферментом, особенно интересным с точки зрения регуляции (разд. 22.14). Пиримидиновое кольцо образуется в следующей реакции, когда карбамоиласпартат циклизуется с отщеплением молекулы воды и образованием *дигидрооротата*. Затем при дегидратации дигидрооротата образуется *оротат*.

22.8. Пиримидиновое кольцо синтезируется из карбамоилфосфата и аспартата

В отличие от последовательности реакций синтеза пуриннуклеотидов de novo пиримидиновое кольцо вначале собирается и только затем присоединяется к рибозофосфату с образованием пиримидиннуклеотида. Донором рибозофосфата при синтезе пиримидиннуклеотидов, так же как и при синтезе пуриннуклеотидов, служит ФРПФ. Предшественники пиримидинового кольца – карбамоилфосфат и аспартат (рис. 22.11).

Синтез пиримидинов начинается с образования *карбамоилфосфата*, который служит также промежуточным продуктом синтеза мочевины (разд. 18.4). Синтез этого активированного донора карбамоильной группы в клетках эукариот компартментализован. Карбамоилфосфат, который используется для синтеза пиримидинов, образуется в цитозоле, тогда как карба-

22.9. К оротату присоединяется рибозофосфатный остаток ФРПФ

Следующий этап синтеза пиримидиннуклеотидов – *присоединение рибозофосфатной группы*. Оротат (свободный пиримидин) реагирует с ФРПФ с образованием *оротидилата* (пиримидиннуклеотид). Протекание этой реакции, которую катализирует оротидилат-пирофосфорилаза, поддерживается гидролизом пирофосфата. Затем оротидилат декарбоксилируется, образуя *уридилат* (уридинмонофосфат, UMP) – главный пиримидиннуклеотид.

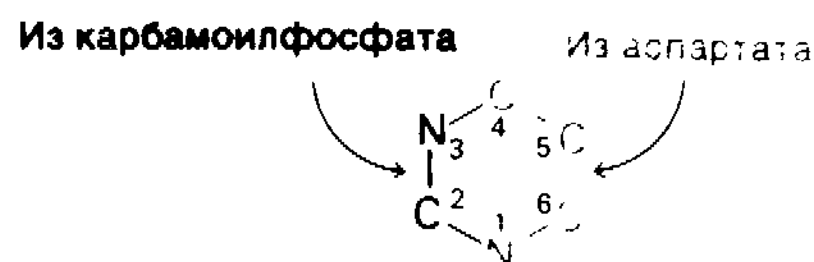
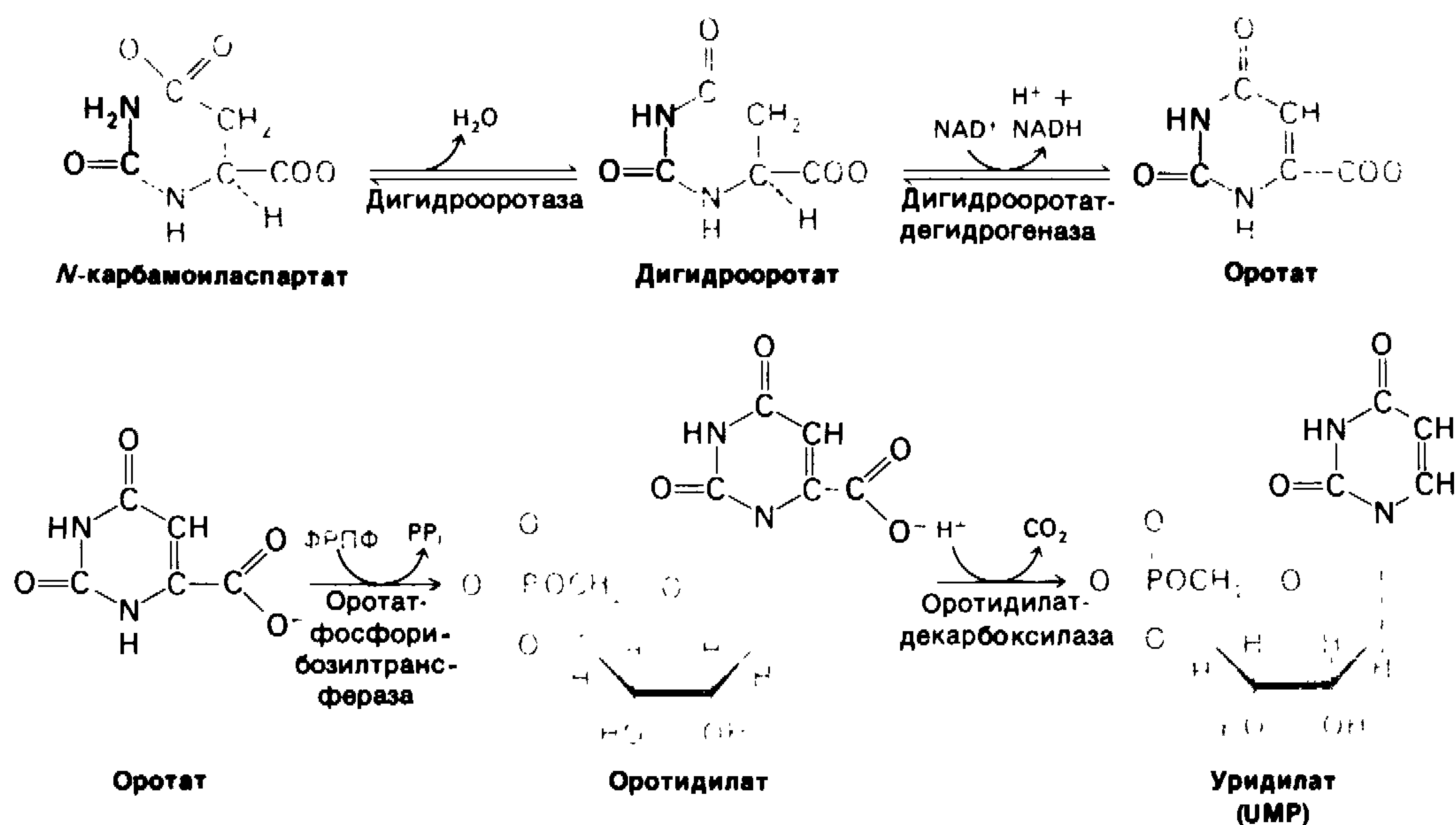


Рис. 22.11. Происхождение атомов пиримидинового кольца. C-2 и N-3 происходят из карбамоилфосфата, остальные атомы кольца – из аспартата.



22.10. Первые три фермента биосинтеза пиримидинов синтезируются в виде одной полипептидной цепи

У *E. coli* шесть ферментов, синтезирующих UMP из простых предшественников, видимо, не связаны друг с другом. У высших организмов, напротив, несколько из этих ферментов образуют мультиферментный комплекс. Содержание этого комплекса в клетках млекопитающих сильно увеличивается под действием N-(*фосфонацетил*)-*L-аспартата* (ФАА), мощного ингибитора аспартат-транскарбамоилазы (АТКазы). ФАА прочно связывается с АТКазой ($K_i = 10^{-8}$ М), так как имеет определенное структурное сходство с переходным комплексом, возникающим в процессе катализа (рис. 22.12). Выживающие клетки преодолевают ингибирующее действие ФАА, синтезируя в 100 раз больше АТКазы, чем нормальные клетки. Концентрации карбамоилфосфат-синтазы и дигидрооротазы также увеличиваются в 100 раз, тогда как активности ферментов, катализирующих последующие реакции биосинтеза пиримидинов, практически не изменяются. Эти данные позволили установить тот факт, что *карбамоилфосфат-синтаза, аспартат-транскарбамоилаза* и *дигидрооротаза ковалентно связаны в составе единой полипептидной цепи с мол. массой 200 кДа.* Ферменты, катализирующие две последние реакции биосинтеза пиримидинов, оротат-фосфорибозилтрансфераза и оротидилат-декарбоксилаза, образуют другой комплекс. Возможно, они также ковалентно связаны. Напомним, что комплекс синтетазы жирных кислот в дрожжах состоит из двух типов полипептидных цепей, каждая из которых содержит несколько ферментов (разд. 17.20). *По всей вероятности, ковалентное связывание функционально родственных ферментов – общее явление у эукариот.* Это может облегчать сборку мультиферментных комплексов. Еще одно предполагаемое преимущество соединения нескольких ферментов в одну полипептидную цепь состоит в том, что они синтезируются в эквимолярных количествах.

22.11. Нуклеозидмоно-, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты способны к взаимопревращениям

Активная форма нуклеотидов в биосинтетических и энергетических реакциях – ди-

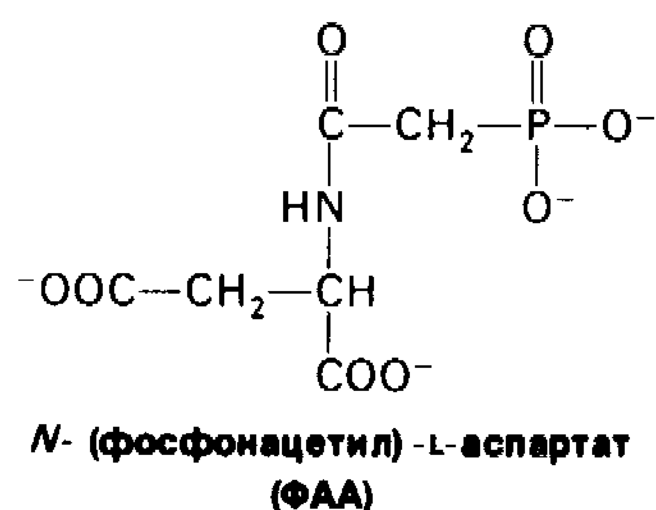


Рис. 22.12. Структура ФАА, эффективного ингибитора АТКазы.

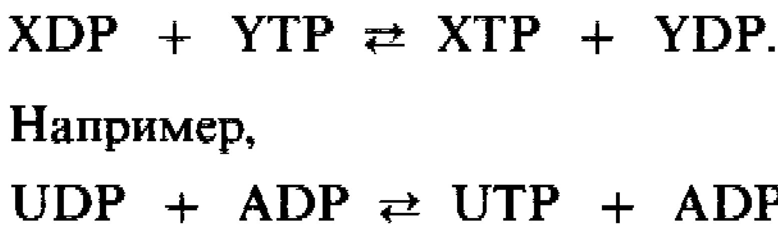
фосфаты и трифосфаты. Нуклеозидмонофосфаты фосфорилируются под действием специфических *нуклеозидмонофосфаткиназ*, использующих в качестве донора фосфатной группы ATP. Например, UMP фосфорилируется под действием *UMP-киназы*:

UMP + ATP ⇄ UDP + ADP.

AMP, ADP и ATP превращаются друг в друга под действием *аденилаткиназы* (называемой также миокиназой). Константа равновесия этих реакций близка к 1:

AMP + ATP ⇄ ADP + ADP.

Нуклеозиддифосфаты и нуклеозидтрифосфаты превращаются друг в друга под действием *нуклеозид-дифосфат – киназы*, фермента с широкой специфичностью, в отличие от монофосфаткиназ. В следующих уравнениях X и Y могут быть любыми рибо- или дезоксирибонуклеозидами из большого набора этих соединений:



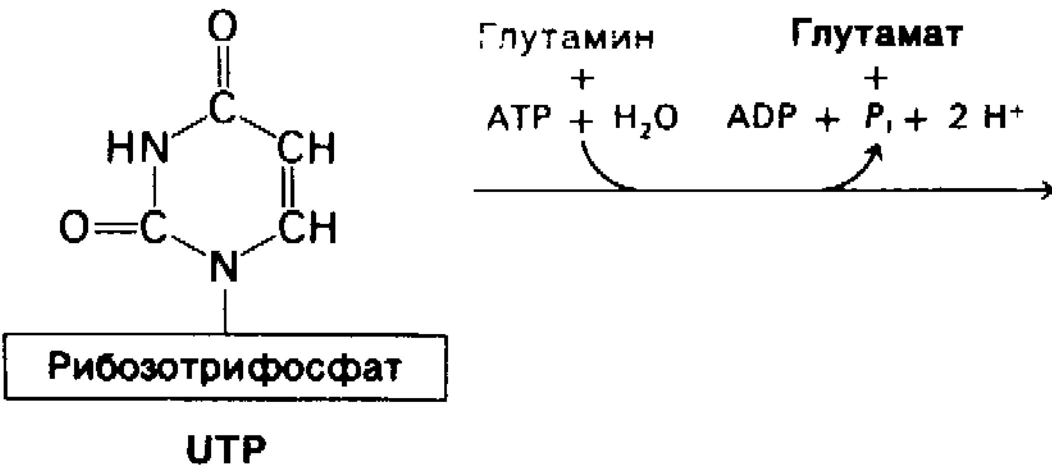
XDP + YTP ⇄ XTP + YDP.

Например,

UDP + ADP ⇄ UTP + ADP.

22.12. CTP образуется путем аминирования UTP

Цитидинтрифосфат (CTP) образуется из другого основного пиримидинрибонуклеотида, уридинтрифосфата (UTP). Карбонильный кислород при С-4 замещается аминогруппой. У млекопитающих донор аминогруппы – боковая цепь глутамина, а у *E. coli* в этой реакции участвует NH_4^+. В обеих реакциях аминирования расходуется молекула ATP.



22.13. Биосинтез пиримидиннуклеотидов регулируется ингибированием по принципу обратной связи

Решающий этап в биосинтезе пиримидиннуклеотидов *E. coli* – образование N-карбамоиласпартата из аспартата и карбамоил-

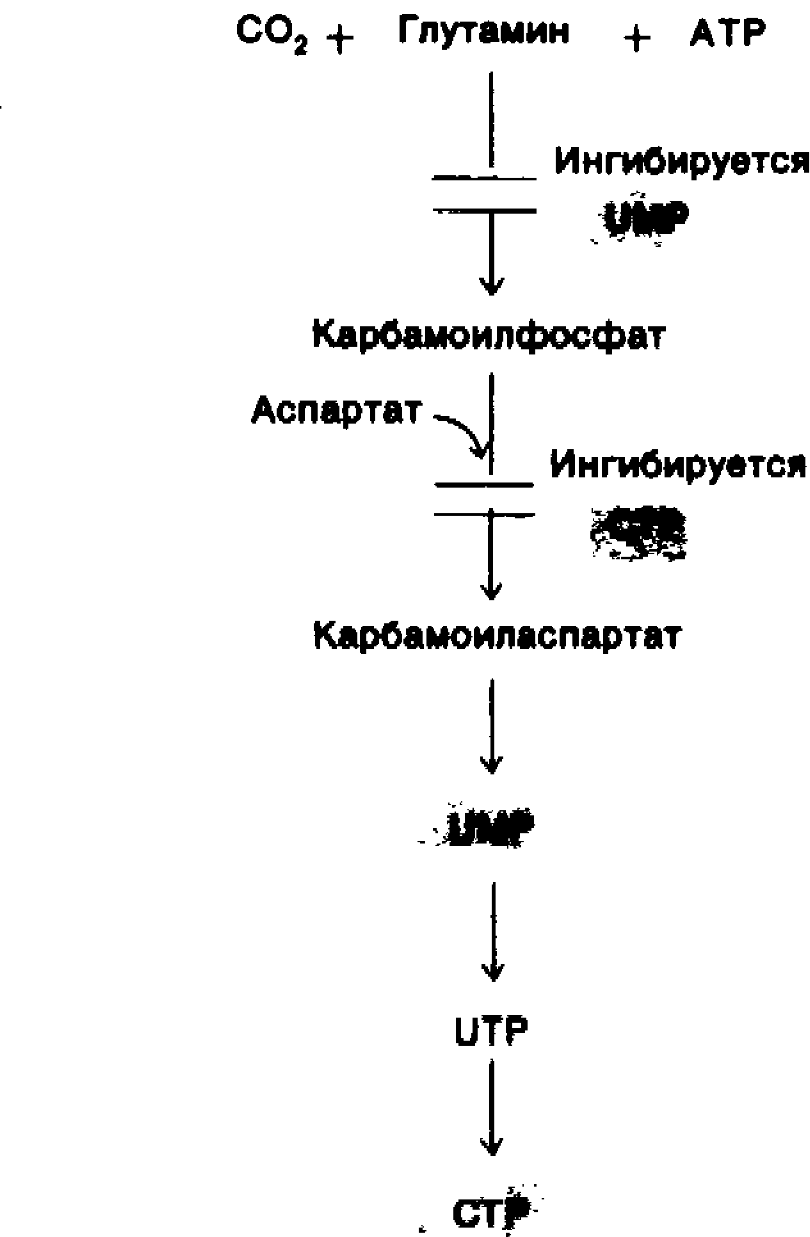


Рис. 22.13. Регуляция биосинтеза пиримидинов.

фосфата. *Фермент, катализирующий эту реакцию, аспартат-транскарбамоилаза, ингибируется конечным продуктом биосинтетического пути – CTP*. Еще один регуляторный элемент – карбамоилфосфат-синтаза; она ингибируется другим продуктом биосинтеза – UMP (рис. 22.13).

Аллостерические свойства АТКазы детально исследовали Джон Герарт и Ховард Шахман (John Gerhart, Howard Schachman). *Связывание карбамоилфосфата и аспартата кооперативно*; это выражается в сигмоидной форме графика зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 22.14). *CTP ингибирует фермент, снижая его сродство к субстратам* и не влияя при этом на V_{max}. Степень ингибирующего эффекта CTP может достигать 90% и зависит от концентрации субстратов. *ATP*, напротив, *активирует АТКазу*. Сродство этого фермента к субстратам

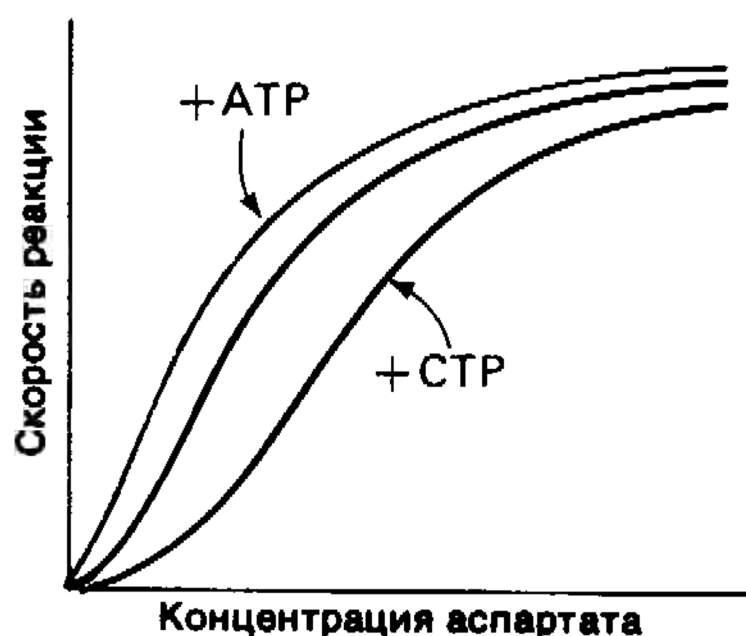


Рис. 22.14. Аллостерические свойства аспартат - транскарбамоилазы. ATP-активатор, CTP-ингибитор фермента [Gerhart J. C., Curr. Top. Cell Regul., **2**, 275 (1970).]

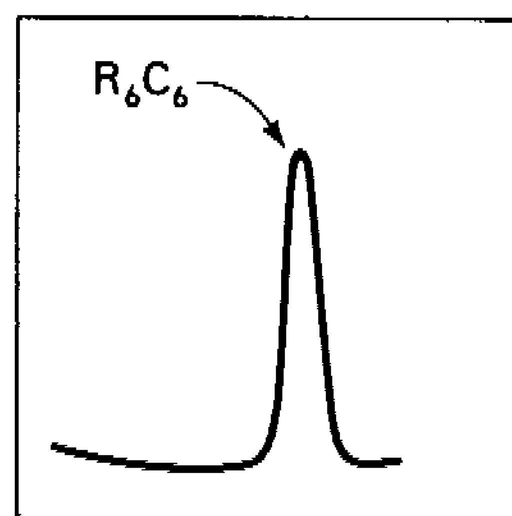
увеличивается под действием ATP, тогда как на V_{max} ATP не оказывает влияния. Кроме того, связывание ATP и CTP с регуляторным участком АТКазы носит конкурентный характер. ATP в высокой концентрации вытесняет CTP из комплекса с ферментом, и последний не может оказывать ингибиторного действия.

Активация АТКазы под действием ATP имеет двоякий биологический смысл. Во-первых, *она уравнивает скорости образования пурин- и пиримидиннуклеотидов.* Для синтеза нуклеиновых кислот необходимы сравнимые количества этих двух типов нуклеотидов. Во-вторых, *активация под действием ATP сигнализирует о его достаточной концентрации в качестве субстрата* для некоторых реакций биосинтеза пиримидиннуклеотидов, например для синтеза карбамоилфосфата и фосфорилирования UMP до UTP.

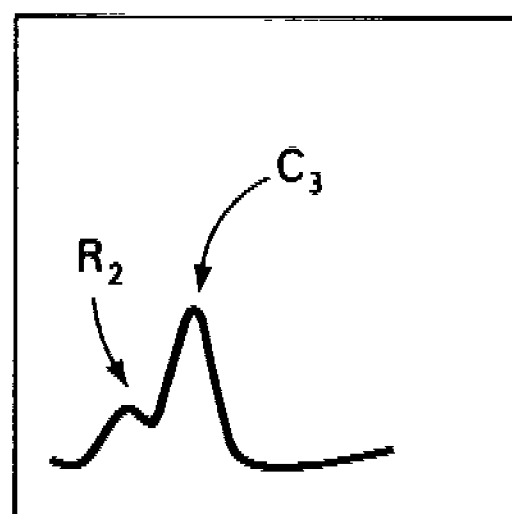
22.14. Аспартат-транскарбамоилаза состоит из отдельных каталитической и регуляторной субъединиц

Если обработать АТКазу каким-нибудь органическим соединением ртути, например *n*-гидроксимеркурийбензоатом, она теряет свои регуляторные свойства. ATP и CTP уже не влияют на ее каталитическую активность. Кроме того, связывание субстратов становится некооперативным. Тем не менее модифицированный фермент обладает полноценной каталитической активностью. Такая утрата регуляторных свойств при сохранении ферментативной активности называется *десенсибилизацией.*

Десенсибилизация АТКазы органическими соединениями ртути сопровождается ее *диссоциацией на субъединицы двух типов,* как показали исследования с применением ультрацентрифугирования (рис. 22.15). Коэффициент седиментации нативного фермента 11,6S, а коэффициент седиментации диссоциированных субъединиц - 2,8 и 5,8 S. Эти субъединицы можно легко разделить с помощью ионообменной хроматографии, так как они существенно различаются по заряду, или с помощью ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы, так как они различаются по размеру. После того как субъединицы разделены, *n*-гидроксимеркурийбензоат можно удалить. Бóльшая субъединица каталитически активна; ее называют *каталитической субъединицей.* Однако ATP и CTP не влияют на активность выделенной каталитической субъединицы. Меньшая субъеди-



А



Б

Рис. 22.15. Картина седиментации в ультрацентрифуге нативной АТКазы (*А*) и того же фермента, продиссоциировавшего под действием соединения ртути на регуляторную и каталитическую субъединицы (*Б*). [Gerhart J. C., Schachman H. K., Biochemistry, **4**, 1054 (1965).]

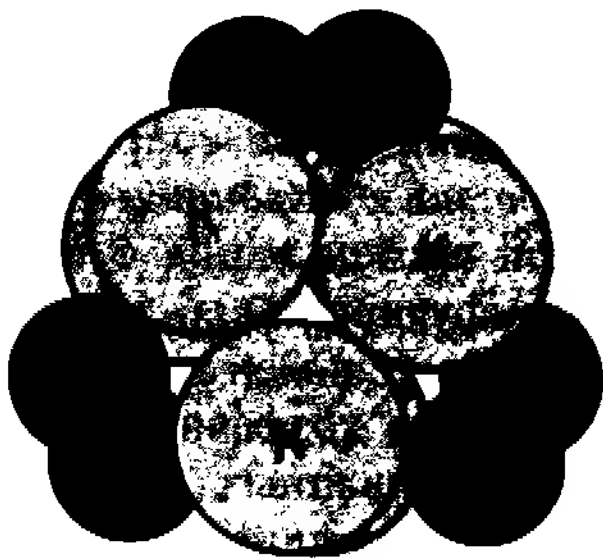


Рис. 22.16. Расположение каталитических (К, синие шарики) и регуляторных (Р, розовые шарики) субъединиц аспартат-транскарбамоилазы. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром William Lipscomb.)

ница, называемая *регуляторной субъединицей*, лишена каталитической активности, но содержит специфические участки связывания СТР и АТР. Каталитическая субъединица состоит из трех полипептидных цепей с мол. массой по 34 кДа, а регуляторная – из двух цепей по 17 кДа.

При смешивании каталитической и регуляторной субъединиц они быстро соединяются. Образуется комплекс с такой же структурой, как и нативный фермент – R_6C_6:



$$3R_2 + 2C_3 \rightarrow R_6C_6.$$

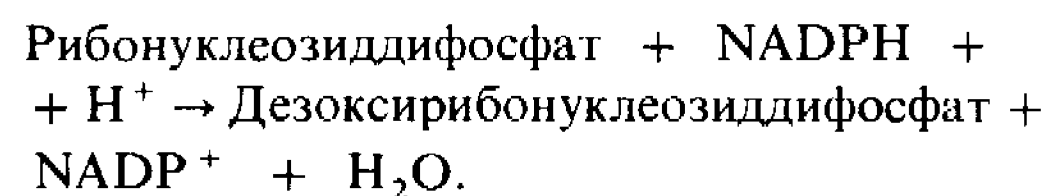
Более того, *реконструированный фермент обладает такими же аллостерическими свойствами, как и нативный фермент.*

В лаборатории Уильяма Липскома (William Lipscomb) проводится кристаллографическое изучение АТКазы с помощью рентгеноструктурного анализа. Карта электронной плотности с разрешением 3,0 Å показывает, что два каталитических тримера (C_3) расположены сверху и снизу от расположенного экваториально пояса, состоящего из трех регуляторных димеров (R_2) (рис. 22.16). Особенность этой молекулы состоит в том, что она содержит большую центральную полость, доступ в которую открывается через несколько каналов. Интересно отметить, что аллостерические участки связывания СТР расположены далеко от каталитических центров.

22.15. Дезоксирибонуклеотиды синтезируются путем восстановления рибонуклеозиддифосфатов

Перейдем теперь к синтезу дезоксирибонуклеотидов. Эти предшественники ДНК образуются путем восстановления рибонуклеотидов. 2'-гидроксильная группа остатка рибозы замещается атомом водорода.

В клетках *E.coli* и млекопитающих субстратами этой реакции служат рибонуклеозиддифосфаты. Общая стехиометрия этой реакции следующая:



Рибонуклеозиддифосфат + NADPH + + H^+ → Дезоксирибонуклеозиддифосфат + $NADP^+$ + H_2O.

В действительности механизм реакции гораздо сложнее, чем можно судить по этому уравнению. Питер Рейхард (Peter Reichard)

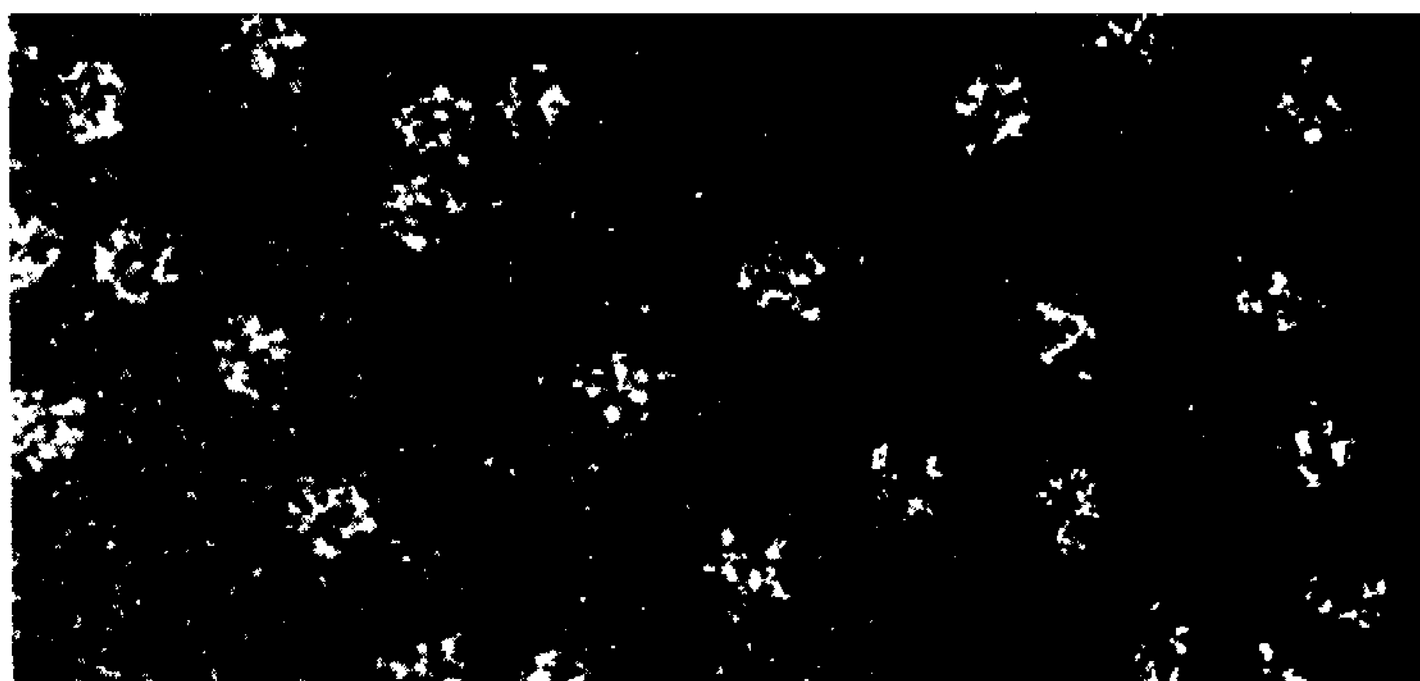


Рис. 22.17. Электронная микрофотография аспартат-транскарбамоилазы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley C. Williams.)

показал, что у *E.coli* электроны переносятся на субстрат через ряд сульфгидрильных групп. Заключительную реакцию катализирует *рибонуклеотид-редуктаза* (ее также называют рибонуклеозиддифосфат-редуктазой). Стехиометрия этой реакции описывается следующим уравнением:

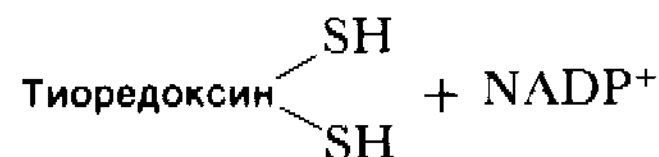




Этот фермент состоит из двух субъединиц: B1 (димер с мол. массой 160 кДа) и B2 (димер с мол. массой 78 кДа). В субъединице B1 имеются участки связывания рибонуклеотидных субстратов и аллостерических эффекторов. Кроме того, B1 содержит сульфгидрильные группы, которые служат непосредственными донорами электронов при восстановлении рибозного остатка. B2–белок, содержащий железо и серу; он участвует в катализе, образуя необычный свободный радикал ароматического кольца тирозинового остатка. Субъединицы B1 и B2 вместе участвуют в формировании активных центров фермента (рис. 22.18).

Каким образом электроны переносятся с NADPH на сульфгидрильные группы в каталитическом центре рибонуклеотид-редуктазы? Один из переносчиков восстановительного потенциала – *тиоредоксин*, белок с мол. массой 12 000 Да, содержащий два цистеиновых остатка в непосредственной близости друг от друга (рис. 22.19). Эти сульфгидрильные группы окисляются,





образуя дисульфид в результате реакции, катализируемой рибонуклеотид-редуктазой. Восстановленный тиоредоксин в свою очередь регенерируется в ходе реакции NADPH с окисленным тиоредоксином.

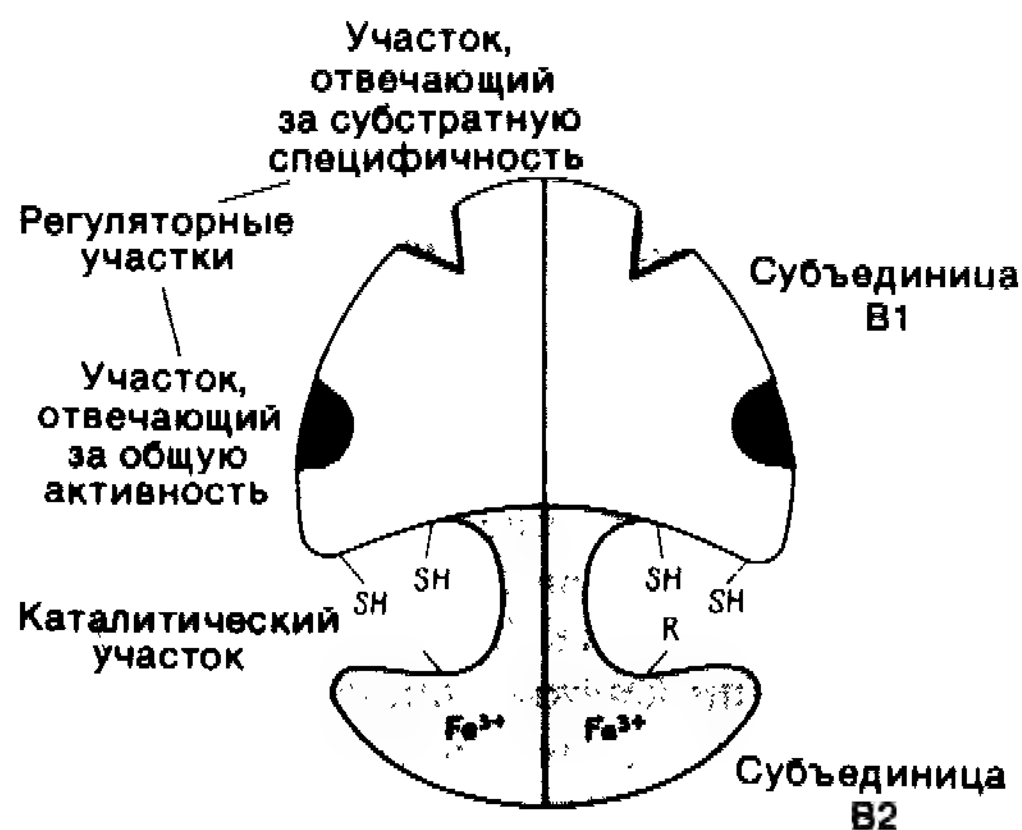


Рис. 22.18. Модель рибонуклеотид-редуктазы *E. coli*. [Thelander L., Reichard P., Ann. Rev. Biochem., **48**, 136 (1979).]

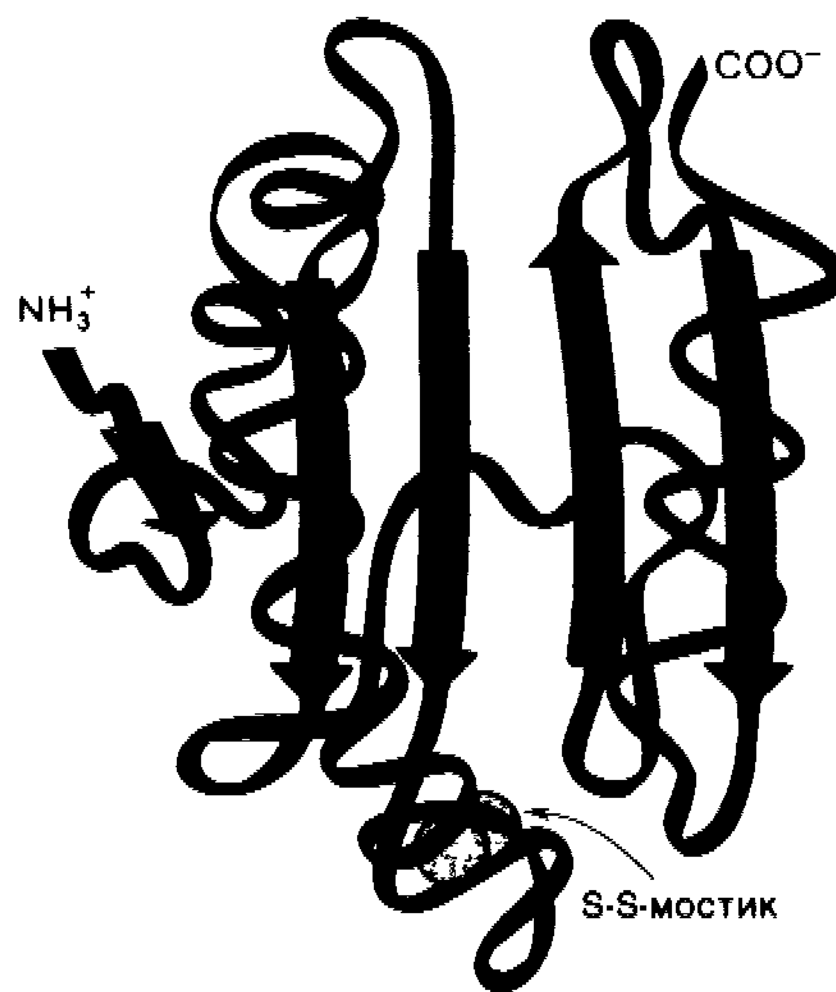


Рис. 22.19. Схематическое изображение конформации основной цепи окисленного тиоредоксина *E. coli*. Желтым цветом показана реакционноспособная дисульфидная связь, участвующая в реакции. (Печатается с любезного разрешения д-ра Carl-Ivar Bränden.)

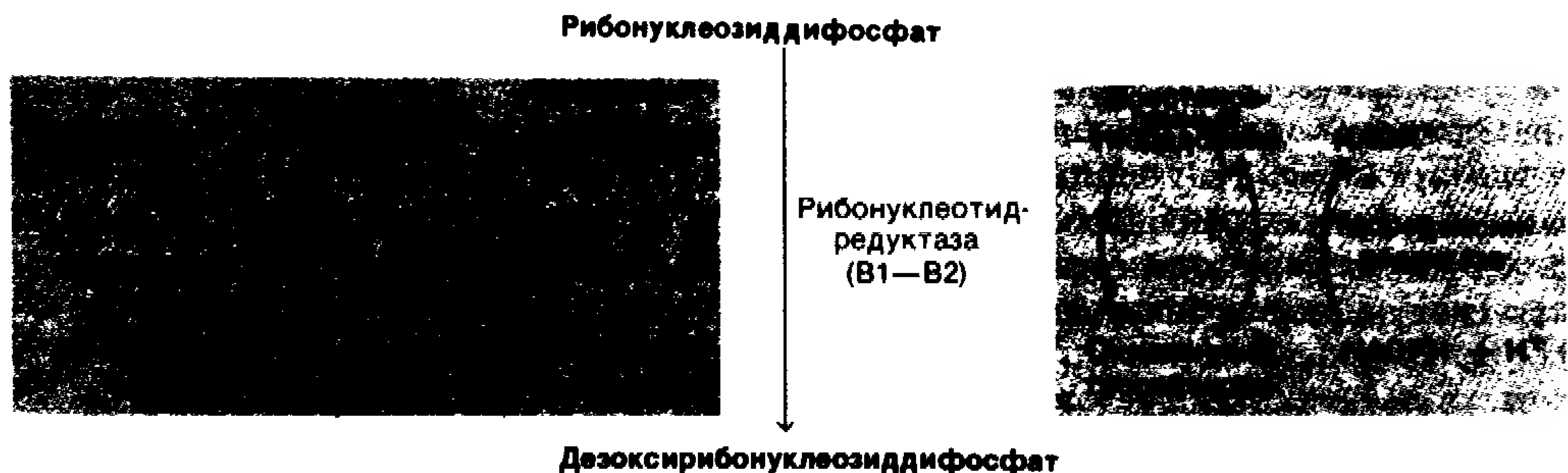


Рис. 22.20. Рибонуклеозиддифосфаты восстанавливаются до дезоксирибонуклеозиддифосфатов под действием рибонуклеотид-редуктазы. Электроны переносятся с молекулы NADPH через ряд сульфгидрильных групп. Источниками восстановительной способности могут служить тиоредоксиновая система (обозначено желтым цветом) и глутаредоксиновая система (обозначено зеленым цветом).

Эта реакция катализируется флавопротеином *тиоредоксин-редуктазой*:

Раньше считалось, что тиоредоксин – единственный переносчик восстановительной способности на рибонуклеотид-редуктазу. Однако было обнаружено, что мутант *E.coli*, полностью лишенный тиоредоксина, синтезирует дезоксирибонуклеотиды. Это неожиданное открытие привело к выделению второй системы переносчиков. Оказалось, что донор электронов у этого мутанта – цистеинсодержащий трипептид *глутатион*. Как говорилось выше (разд. 15.12), *глутатион-редуктаза* катализирует восстановление окисленного глутатиона (дисульфидной формы) за счет NADPH. Кроме того, для переноса восстановительной способности глутатиона на рибонуклеотид-редуктазу нужен еще один белок *глутаредоксин* (рис. 22.20). Соотношение активностей тиоредоксиновой и глутаредоксиновой систем в восстановлении рибонуклеотидов в нормальных клетках пока неизвестно.

Восстановление рибонуклеотиддифосфатов тонко регулируется аллостерическими взаимодействиями. Субъединица B1 рибонуклеотид-редуктазы содержит два типа аллостерических участков: один из них регулирует *общую активность* фермента, другой – *субстратную специфичность*. Общая каталитическая активность рибонуклеотид-редуктазы снижается при связывании dATP, который сигнализирует об изобилии дезоксирибонуклеотидов. Это ингибирование по механизму обратной связи обращается при связывании ATP. Связывание dATP или ATP с участками, регулирующими субстратную специфичность, увеличивает восстановление пиримидиннуклеотидов UDP и CDP. Восстановление GDP стимулируется связыванием dTTP, который также ингибирует восстановление пиримидиннуклеотидов. Последующее увеличение концентрации dGTP приводит к стимуляции восстановления ADP. Очевидно, рибонуклеотид-редуктаза имеет множество конформационных состояний с различными каталитическими свойствами. Эта сложная схема регуляции обеспечивает синтез достаточного количества четырех дезоксирибонуклеотидов для синтеза ДНК.

22.16. Дезокситимидилат образуется путем метилирования дезоксиуридилата

Урацил не входит в состав ДНК. Вместо него ДНК содержит *тимин*, метилированный аналог урацила. Последний штрих вносится в структуру этого предшественника на уровне дезоксирибонуклеозидмонофосфата: дезоксиуридилат (dUMP) метилируется с образованием дезокситимидилата (dTMP) под действием *тимидилат-синтетазы*. Донором метильных групп в этой реакции служит производное тетрагидрофолята, а не S-аденозилметиозин. Метильный углерод происходит из N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолята. Обратите внимание, что метильная группа, которая вводится в дезоксиуридилат, находится в более восстановленном состоянии, чем

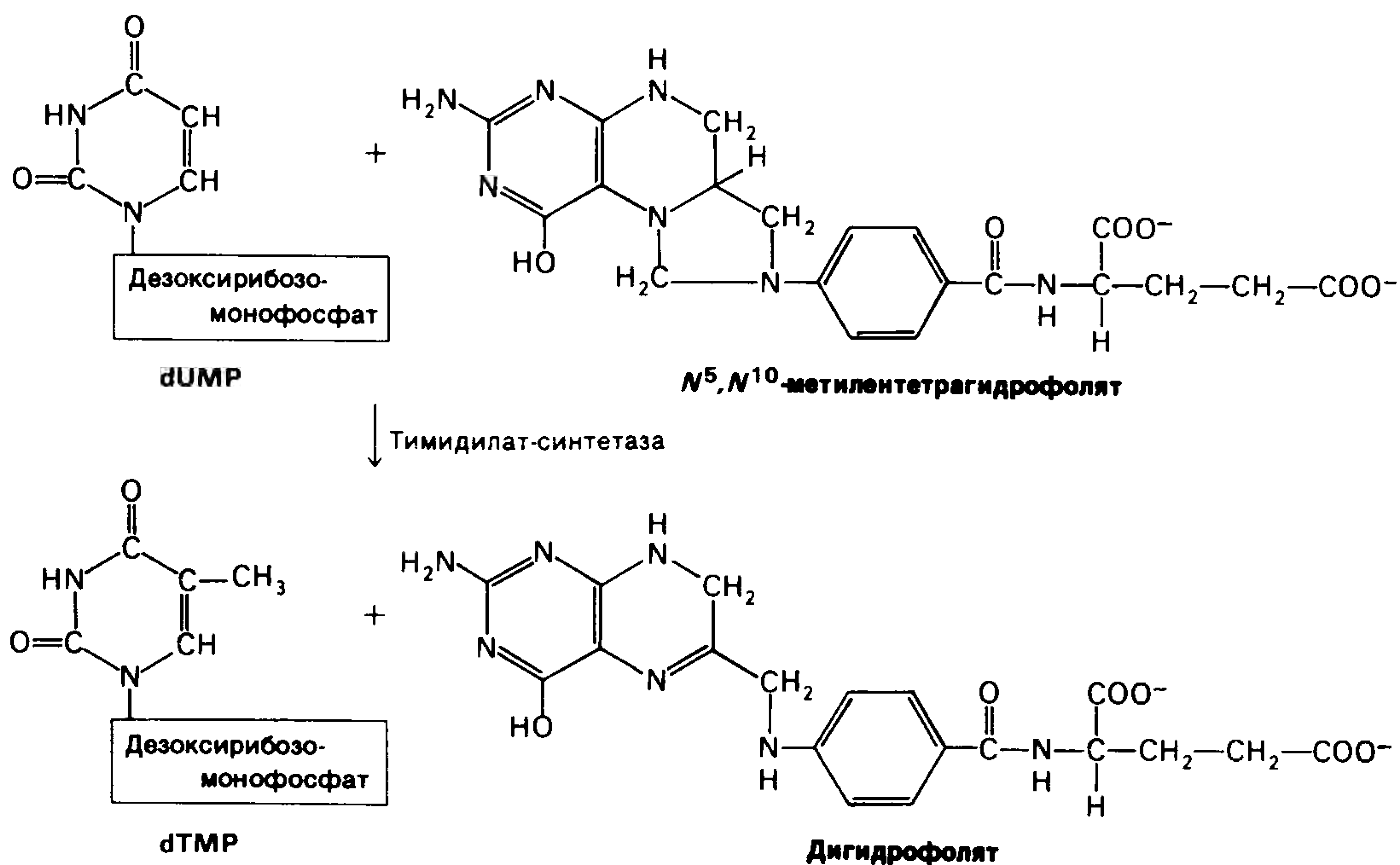


Рис. 22.21. Синтез dTMP из dUMP.

метиленовая группа в этом производном тетрагидрофолята. Откуда же берутся электроны для этой реакции восстановления? Два электрона переходят из самого остатка тетрагидрофолята в виде гидрид-иона (H^-), который отщепляется от кольца. Этот водород входит в метильную группу dTMP. Тетрагидрофолят в этой реакции окисляется до дигидрофолята. Таким образом, N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолят служит и *донором электронов*, и *донором одноуглеродного фрагмента* в реакции метилирования (рис. 22.21).

Напомним, что перенос одноуглеродного фрагмента происходит на уровне тетрагидрофолята, а не дигидрофолята. Следовательно, тетрагидрофолят обязательно должен регенерироваться. Это происходит под действием *дигидрофолят-редуктазы* с использованием в качестве восстановителя NADPH:

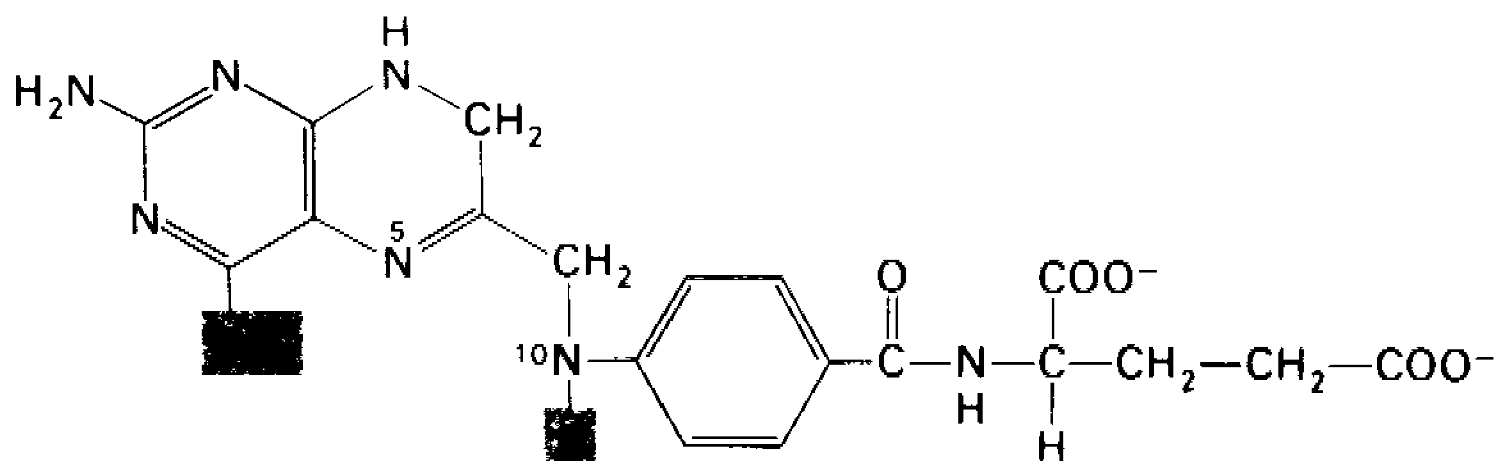


Дигидрофолят + NADPH + H^+ →
→ Тетрагидрофолят + $NADP^+$.

22.17. Некоторые противораковые препараты блокируют синтез дезокситимидилата

Быстро делящиеся клетки нуждаются в большом количестве дезокситимидилата для синтеза ДНК. Чувствительность этих клеток к ингибированию синтеза dTMP используется в химиотерапии рака (рис. 22.22). Обычно в качестве мишеней избирают ферменты тимидилат-синтетазу и дигидрофолят-синтетазу. *Фторурацил* (или фтордезоксиуридин) – широко используемый в клинической практике противораковый препарат. Он превращается in vivo во *фтордезоксиуридилат* (F-dUMP). *Этот аналог* dUMP *необратимо ингибирует тимидилат-синтетазу после того, как он проходит в качестве нормального субстрата часть каталитического цикла.* Прежде всего сульфгидрильная группа фермента присоединяется к С-6 связанного F-dUMP. Затем метилентетрагидрофолят присоединяется к С-5 этого промежуточного продукта. Если в реакции участвует dUMR, то на следующем этапе гидрид-ион перемещается на метиленовую группу метилентетрагидрофолята, и от С-5 связанного нуклеотида отнимается протон. Но если в реакцию вступает F-dUMP, фермент не может отнять F^+ и катализ блокируется на стадии образования ковалентного комплекса между F-dUMP, метилентетрагидрофолятом и сульфгидрильной группой фермента (рис. 22.23).

Синтез dTMP можно блокировать так-



Строение аминоптерина (R = H) и аметоптерина (R = CH_3)

же, подавив регенерирование тетрагидрофолята (рис. 22.22). Аналоги тетрагидрофолята, например *аминоптерин и аметоптерин (метотрексат)*, – мощные конкурентные ингибиторы дигидрофолят-редуктазы ($K_i < 10^{-9}$ М) (рис. 22.24). Аметоптерин – важное лекарственное средство при лечении острой лейкемии и хориокарциномы.

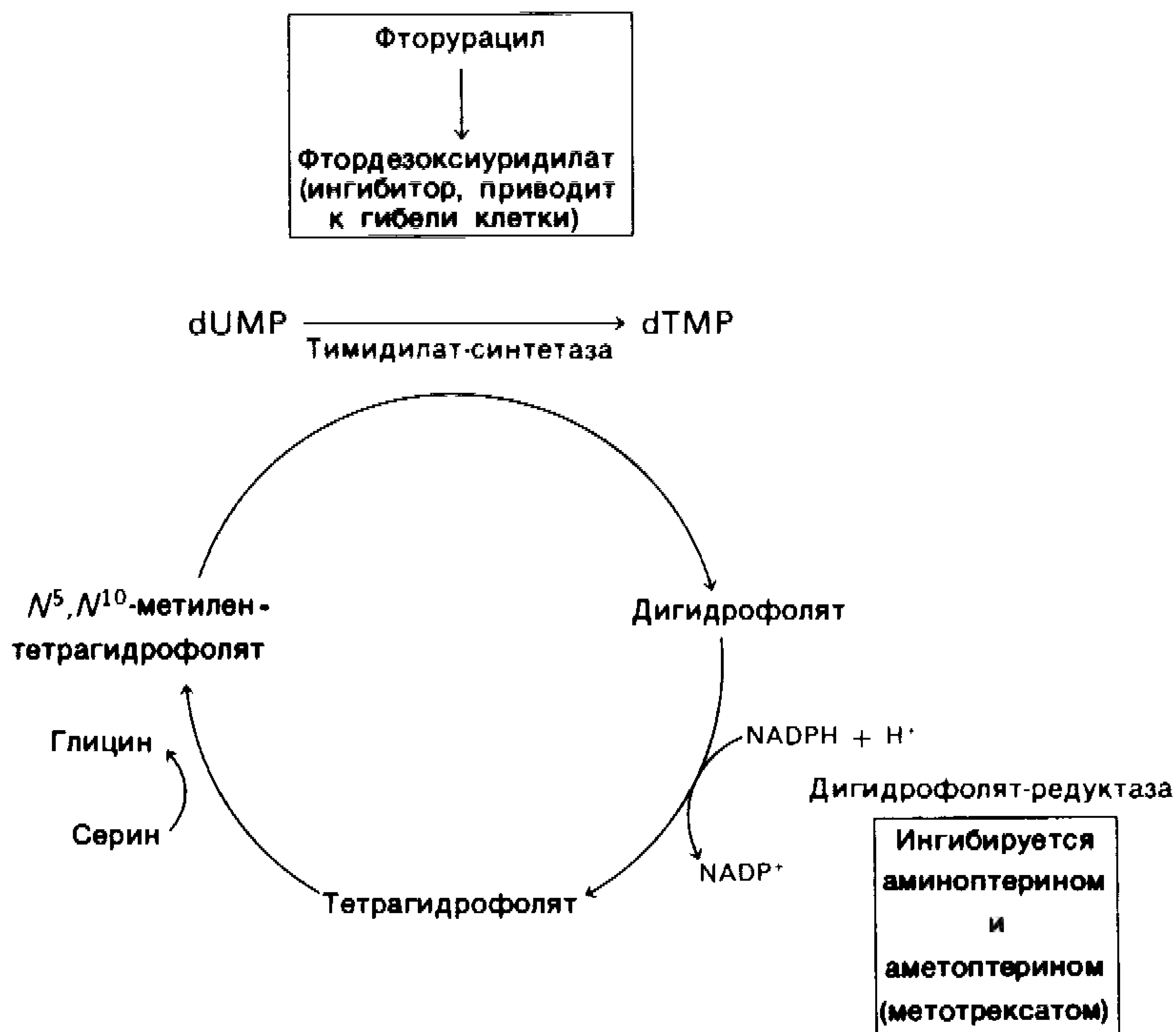


Рис. 22.22. Тимидилат-синтетаза и дигидрофолят-редуктаза – мишени действия различных препаратов при химиотерапии рака. Фтордезоксиуридилат ингибирует метилирование dUMP. Аналоги фолиевой кислоты аминоптерин и аметоптерин (метотрексат) блокируют регенерирование тетрагидрофолята.

22.18. АТР – предшественник NAD^+, FAD и кофермента А

Биосинтез никотинамидадениндинуклеотида (NAD^+) начинается с образования *рибонуклеотида никотиновой кислоты* из никотината и ФРПФ. *Никотинат* (его также называют *ниацином*) происходит из триптофана. Организм человека способен синтезировать необходимое количество никотината, если с пищей поступает достаточно триптофана. Если же с пищей поступает мало триптофана, то организм нуждается также в экзогенном никотинате. *Пеллагра* – заболевание, связанное с недостатком

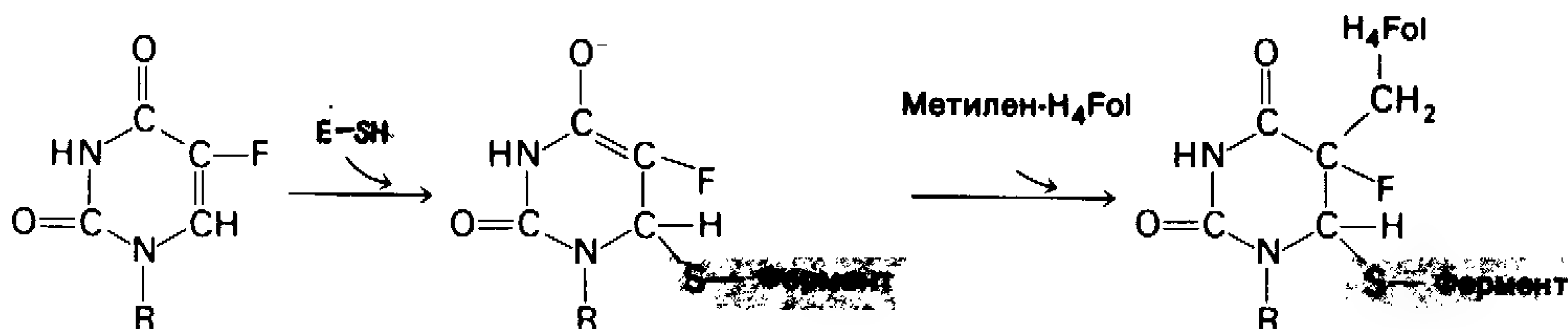


Рис. 22.23. Тимидилат-синтетаза необратимо ингибируется фтордезоксиуридилатом (F-dUMP). Этот аналог образует ковалентный комплекс одновременно с сульфгидрильным остатком фермента (выделен голубым цветом и с молекулой метилентетрагидрофолята (отмечен желтым цветом).

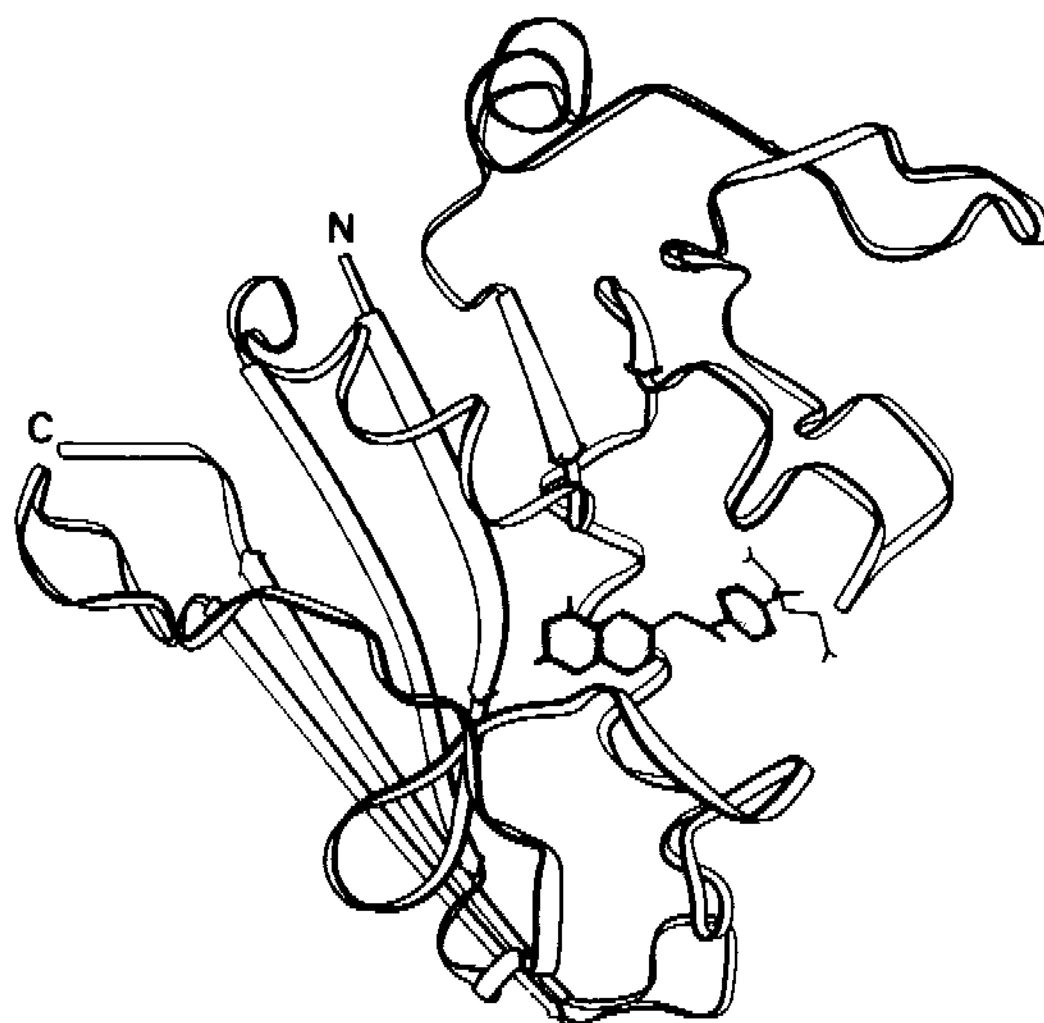


Рис. 22.24. Трехмерная структура дигидрофолят-редуктазы *E. coli* со связанной молекулой аметоптерина (метотрексата). (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Kraut.)

триптофана и никотината в пище.

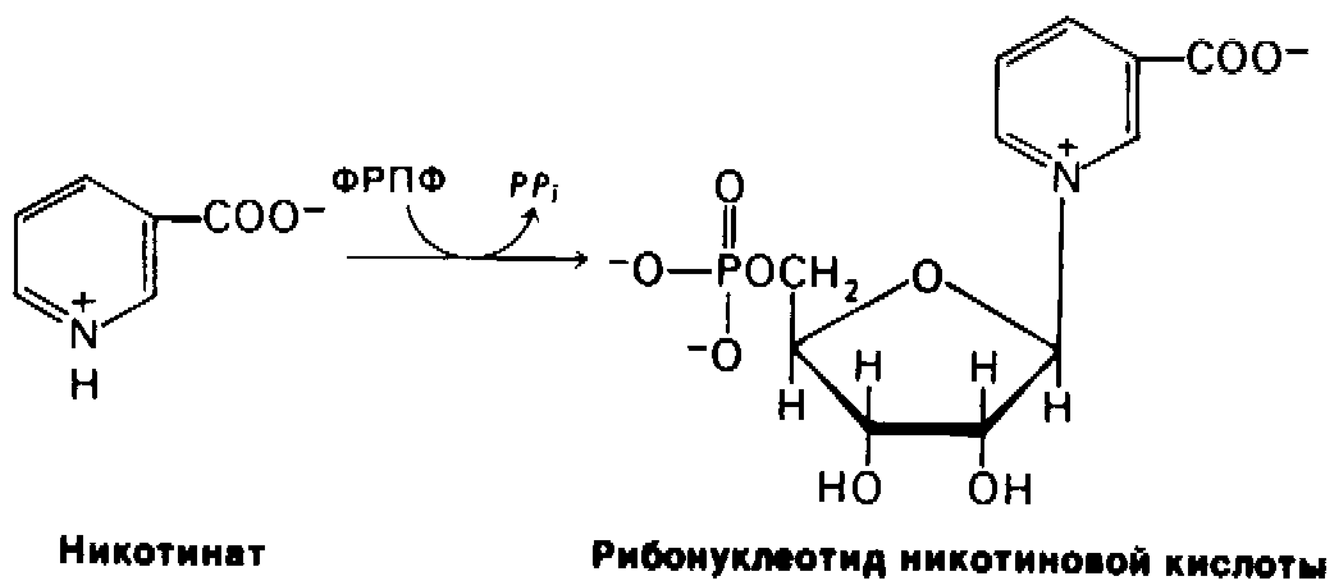
Остаток AMP переносится с ATP на рибонуклеотид никотиновой кислоты, и в результате образуется *дезамидо-NAD*$^+$. На последнем этапе амидогруппа глутамина переносится на карбоксильную группу никотиновой кислоты, давая NAD$^+$ (рис. 22.25). NADP$^+$ образуется из NAD$^+$ путем фосфорилирования 2'-гидроксильной группы остатка рибозы аденина. Этот перенос фосфатной группы катализирует NAD$^+$-киназа.

Флавинадениндинуклеотид (FAD) синтезируется из рибофлавина и двух молекул ATP. Рибофлавин фосфорилируется за счет ATP с образованием *рибофлавин-5'-фосфата* (называемого также *флавинмононуклеотидом*). После этого происходит перенос еще одного остатка AMP второй молекулы ATP на рибофлавин-5'-фосфат, и образуется флавинадениндинуклеотид.

Рибофлавин + ATP →
→ Рибофлавин-5'-фосфат + ADP,

Рибофлавин-5'-фосфат + ATP →
→ Флавинадениндинуклеотид + PP_i.

Синтез *кофермента A* (CoA) в организме животных начинается с фосфорилирования *пантотената* (рис. 22.26). Животные ну-



ATP, PP_i; Glu

Рибоза (P) — COO⁻ (пиридиниевое кольцо, N^+)

Рибонуклеотид никотиновой кислоты

Аденин | Рибоза—(P) P Рибоза

Дезамидо-NAD⁺

Аденин | Рибоза (P) P Рибоза

NAD⁺

Рис. 22.25. Синтез NAD^+ из рибонуклеотида никотиновой кислоты.

[redacted]

Пантотенат

↓ ATP → ADP

$^-O—P(=O)(—O^-)$ [redacted]

4'-фосфопантотенат

↓ Cys + ATP → ADP + P_i

$^-O—P(=O)(—O^-)$ [redacted] —N(H)—C(H)(COO⁻)—CH_2—SH

4'-фосфопантотенилцистеин

↓ → CO_2

$^-O—P(=O)(—O^-)$ [redacted] —N(H)—CH_2—CH_2—SH

4'-фосфопантетеин

↓ ATP → PP_i

Дефосфокофермент А

↓ ATP → ADP

Кофермент А

Рис. 22.26. Синтез кофермента А из пантотената.

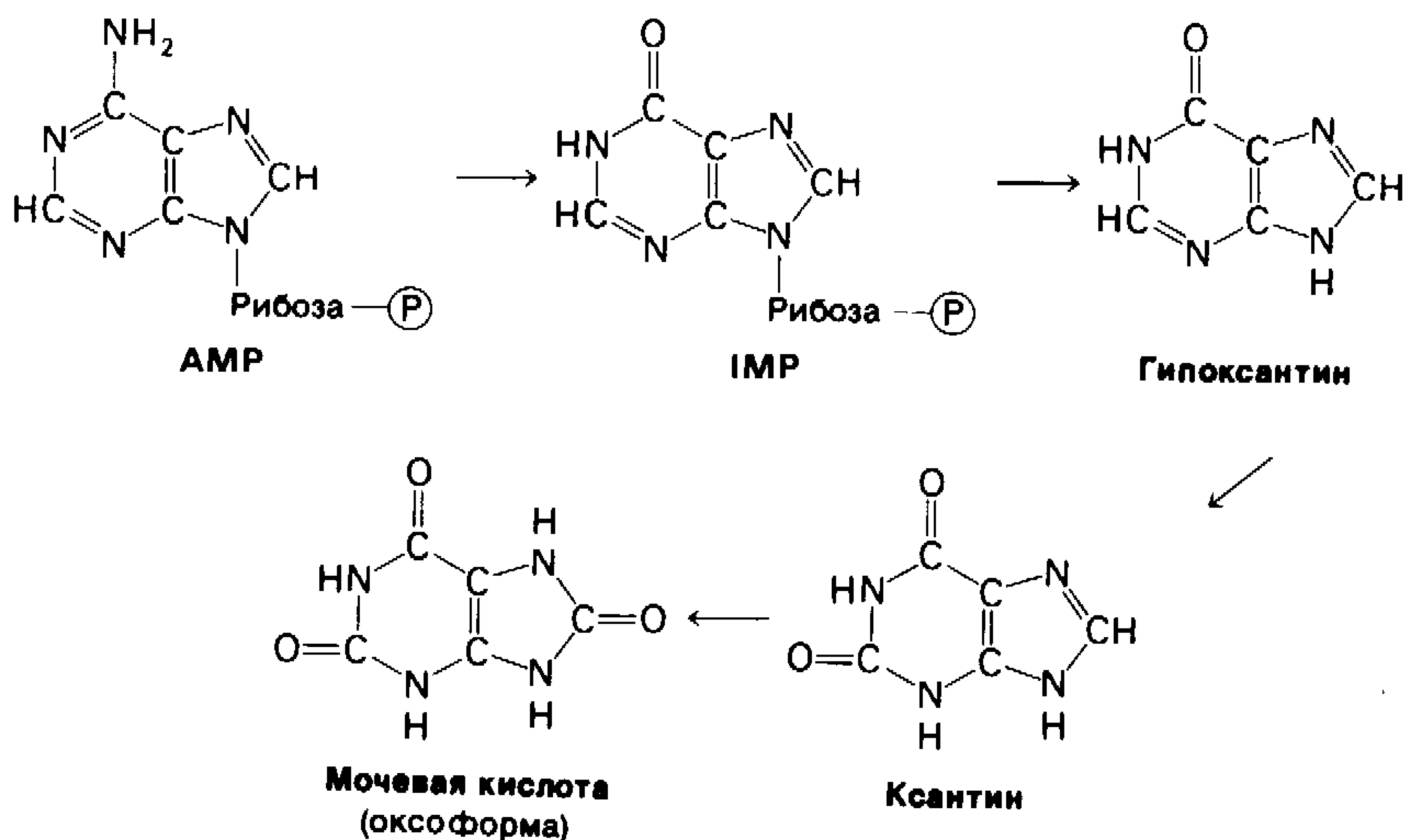


Рис. 22.27. Распад AMP до мочевой кислоты.

ждаются в поступлении пантогената с пищей, а растения и микроорганизмы сами его синтезируют. Затем образуется пептидная связь между карбоксильной группой 4'-фосфопантотената и аминогруппой цистеина. Карбоксильная группа остатка цистеина отщепляется, и образуется *4'-фосфопантотеин*. На этот промежуточный продукт переносится остаток AMP от ATP, и образуется *дефосфокофермент А*. Наконец фосфорилирование 3'-гидроксильной группы дает кофермент А.

Общее в механизме биосинтеза NAD^+, FAD и CoA – это *перенос остатка AMP с ATP на фосфатную группу фосфорилированного промежуточного продукта*. Пирофосфат, который образуется в этой реакции, гидролизуется до ортофосфата. Этот мотив постоянно повторяется в биохимии: *движущей силой биосинтетических реакций часто служит гидролиз высвобождающегося пирофосфата.*

22.19. В организме человека пурины распадаются до мочевой кислоты

В клетке происходит постоянный обмен нуклеотидов. *Нуклеотидазы* гидролитически расщепляют нуклеотиды до нуклеозидов. Фосфоролитическое расщепление нуклеотидов до свободных оснований и рибозо-1-фосфата (или дезоксирибозо-1-фосфата) катализируется *нуклеозид-фосфорилазой*. Рибозо-1-фосфат изомеризуется под действием *фосфорибомутазы*, превращаясь в рибозо-5-фосфат, субстрат синтеза ФРПФ. Некоторые азотистые основания используются повторно для синтеза нуклеотидов в реакциях синтеза из готовых остатков.

Расщепление AMP (рис. 22.27) включает еще один этап. AMP дезаминируется до IMP под действием *аденилатдезаминазы*. Последующие реакции, приводящие к образованию свободного основания гипоксантина, идут обычным путем. *Ксантиноксидаза* – флавопротеин, содержащий молибден и железо, окисляет гипоксантин до *ксантина* и затем до *мочевой кислоты*. В обеих реакциях в качестве окислителя используется молекулярный кислород. Он восстанавливается до H_2O_2, а каталаза разлагает образующуюся перекись на H_2O и O_2. Кроме того, ксантин – промежуточный продукт образования мочевой кислоты из гуанина. *В организме человека мочевая кислота - конечный продукт расщепления пуринов; она выделяется с мочой.*

22.20. У некоторых организмов происходит дальнейший распад мочевой кислоты

У некоторых видов происходит дальнейшее расщепление пуринов (рис. 22.29). Млекопитающие, кроме приматов, выделяют *аллантоин* – продукт окисления мочевой кислоты. Костистые рыбы выделяют *аллантоевую кислоту*, которая образуется путем гидратирования аллантоина. У амфибий и большинства рыб расщепление идет еще дальше: аллантоевая кислота гидролизуется до двух молекул *мочевины*

18–31



и одной молекулы *глиоксилата*. Наконец, некоторые морские беспозвоночные гидролизуют мочевину до NH_4^+ и CO_2. По всей вероятности, ферменты, катализирующие все эти реакции, постепенно утрачивались по мере эволюции приматов.

22.21. Птицы и наземные рептилии выделяют мочевую кислоту вместо мочевины, чтобы сохранить воду

У наземных рептилий и птиц мочевина – не конечный продукт метаболизма азота аминов. Эти животные синтезируют из избытка аминного азота пурины и затем расщепляют их до мочевой кислоты. *Такой обходной путь удаления азота аминосоединений выполняет жизненно важную функцию: он сохраняет воду. В виду своей крайне низкой растворимости при кислотных значениях pH мочевая кислота используется для выведения аминного азота.* pK_a наиболее кислой группы мочевой кислоты равно 5,4.

Кислая моча птиц и наземных рептилий представляет собой суспензию кристаллов мочевой кислоты. Эти Кристаллы экскретируются с минимальным количеством воды. В то же время выделение такого же количества хорошо растворимой мочевины сопровождалось бы большой потерей воды.

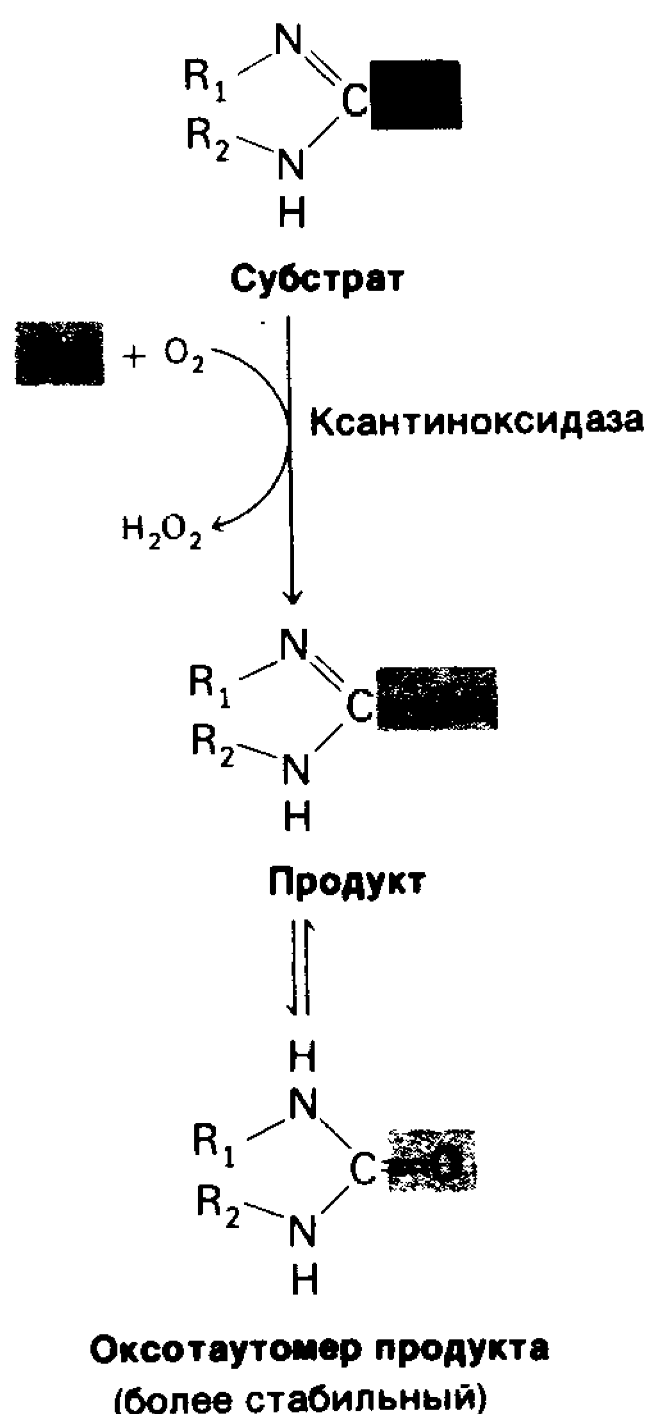


Рис. 22.28. Общая схема реакций окисления, катализируемых ксантиноксидазой.

22.22. Распад пиримидинов

Распад тимина (рис. 22.30) может служить примером расщепления пиримидинов. Тимин распадается до β-аминоизобутирата, который участвует в таких же метаболических реакциях, как обычные аминокислоты. При удалении аминогруппы в результате реакции трансаминирования образуется полуальдегид метилмалоната, который превращается в метилмалонил-СоА. Превращение метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА, которое позволяет вступить этому соединению в цикл трикарбоновых кислот, уже обсуждалось выше (разд. 18.11).

22.23. Избыточное образование мочевой кислоты – причина подагры

Подагра – заболевание, поражающее суставы, оно приводит к артриту. Главное биохимическое проявление подагры – *повышенное содержание мочевой кислоты в сыворотке крови*. Воспаление суставов вызывается *осаждением кристаллов натриевой соли мочевой кислоты*. Отложение кристаллов уратов в почках может также вызвать их заболевание. Подагра чаще всего поражает взрослых мужчин. Яркое описание острого приступа подагры можно найти у выдающегося английского врача XIX в. Томаса Сайденхема (Thomas Sydenham),

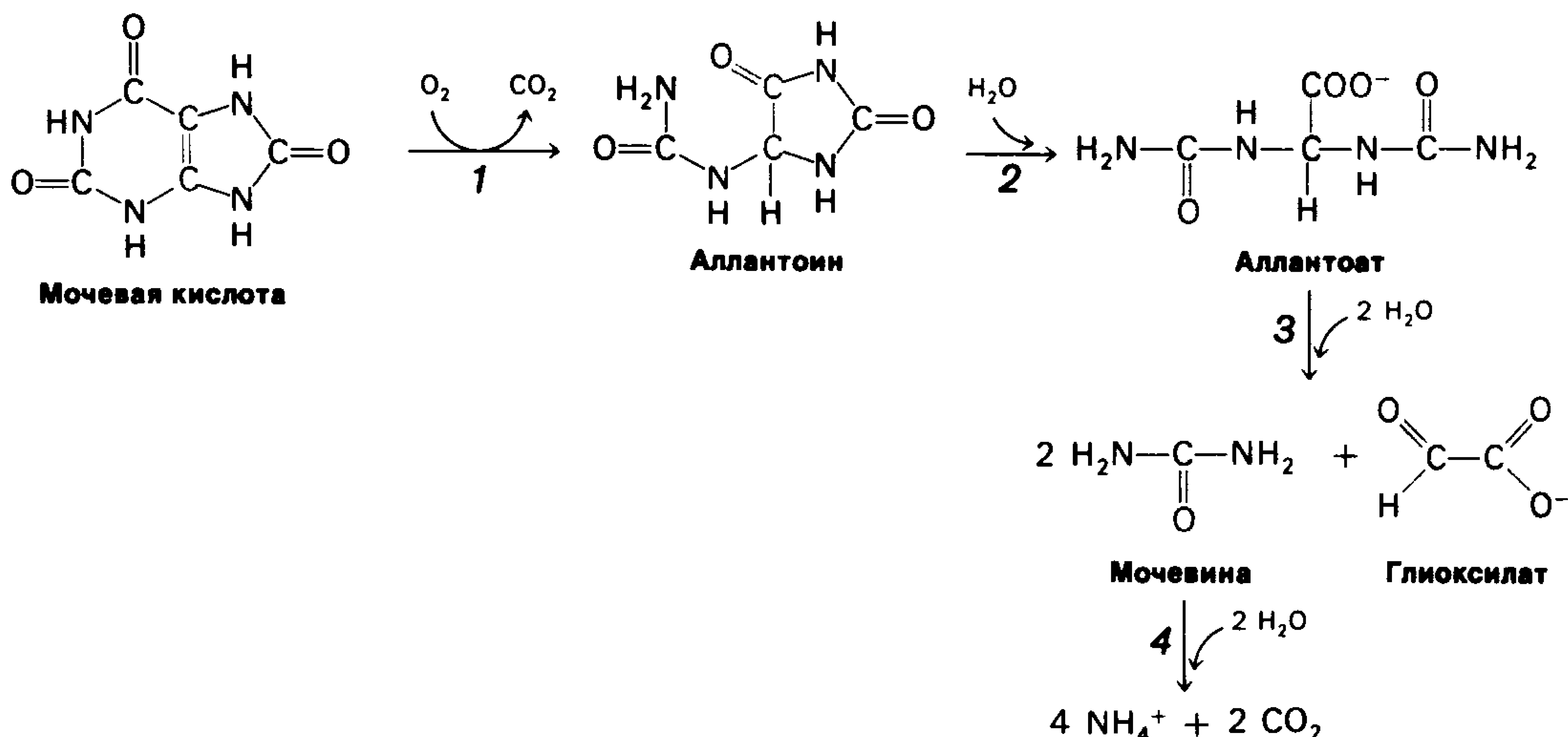


Рис. 22.29. Распад мочевой кислоты до NH_4^+ и CO_2. Эти реакции катализируются ферментами уриказой (*1*), аллантоиназой (*2*), аллантоиказой (*3*) и уреазой (*4*).

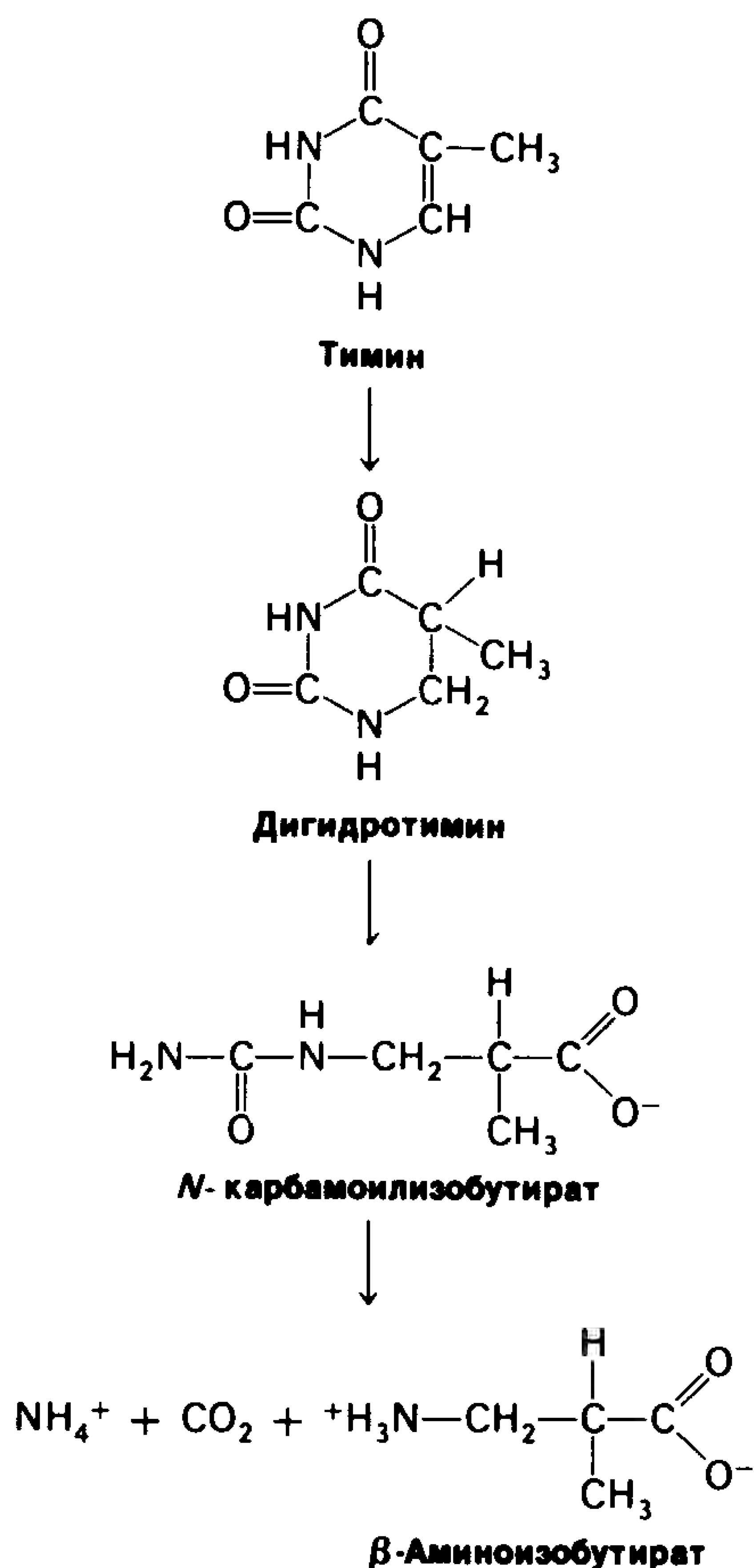


Рис. 22.30. Распад тимина.

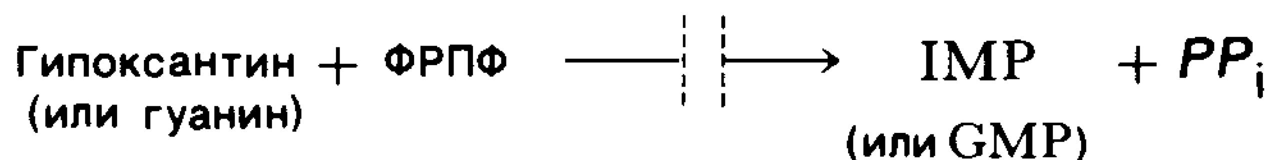
который сам страдал этой болезнью.

«Больной ложится спать и засыпает, чувствуя себя нормально. Около двух часов ночи он просыпается от сильной боли в большом пальце ноги, реже в пятке, лодыжке или в подъеме. Ощущение похоже на боль при вывихе, другие части ноги как будто погружены в холодную воду. Затем начинаются озноб и дрожь, несколько повышается температура. Боль, которая была вначале умеренной, становится сильнее. Вместе с ней усиливаются озноб и дрожь. Через некоторое время боль достигает максимума и распространяется на кости и связки плюсны и голени. Теперь это гложущая боль, она сдавливает и сжимает. Ощущение в пораженной ноге настолько острое, что больной не может вынести тяжесть постельного белья и сотрясения от шагов в комнате. Больной проводит ночь в мучениях, бессоннице, беспрестанно поворачивая больную ногу и изменяя позу. Он мечется все время, пока болит пораженная связка, все сильнее по мере развития приступа».

Биохимические нарушения, лежащие в основе большинства случаев подагры, выяснить не удается. По всей вероятности, подагра – результат различных врожденных нарушений метаболизма, общее проявление которых состоит в *избыточном образовании уратов. У некоторых больных с такой аномалией имеется частичная недостаточность гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы*, фермента, катализи-

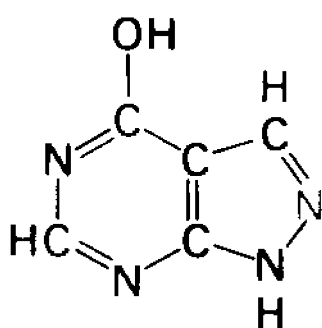
18*

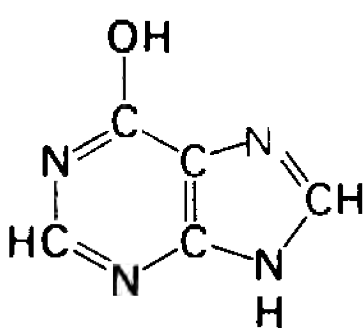
рующего синтез IMP и GMP из готовых фрагментов:

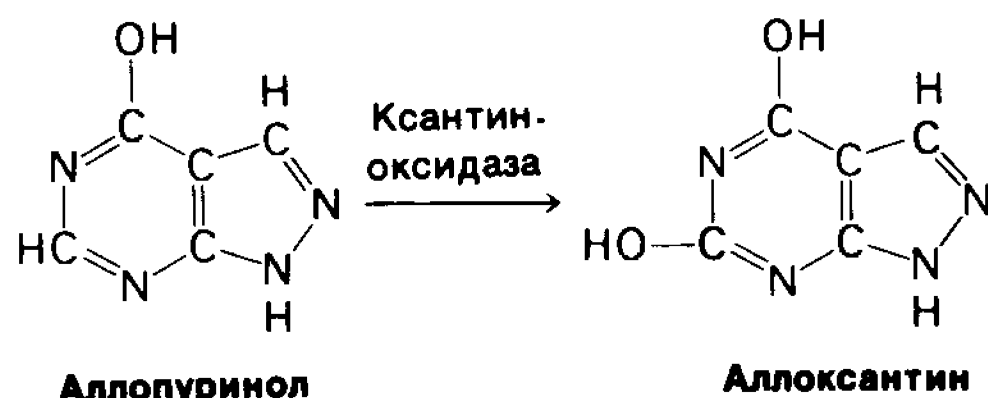


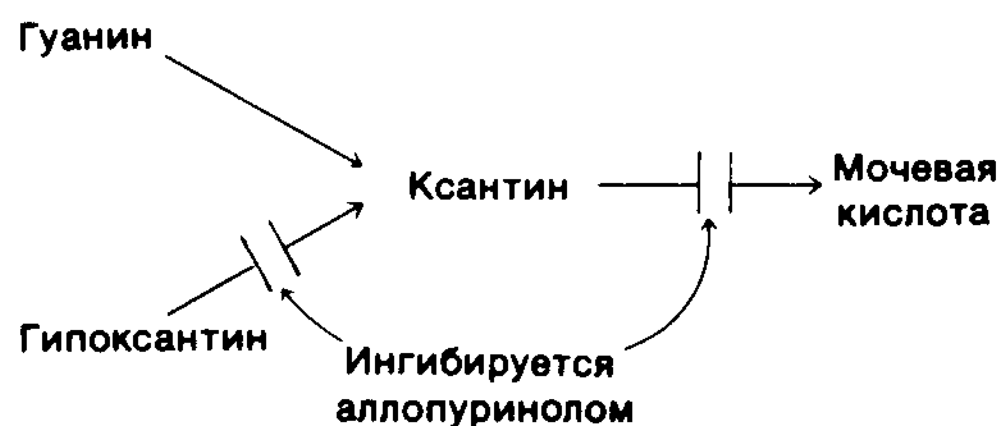
Недостаточность этого фермента приводит к пониженному синтезу GMP и IMP из готовых остатков и увеличению концентрации ФРПФ. В результате происходит *заметное ускорение биосинтеза пуринов de novo.* У некоторых больных подагрой отмечается *аномально высокая активность фосфорибозилпирофосфат-синтетазы.* У таких больных нарушена аллостерическая регуляция этого фермента. В результате образуется *избыточное количество ФРПФ*, который в свою очередь ускоряет синтез пуринов.

Аллопуринол – аналог гипоксантина, в котором атомы N-7 и C-8 поменялись местами. Он используется для лечения подагры. Механизм действия аллопуринола очень интересен: *вначале он действует в качестве субстрата ксантиноксидазы, а затем в качестве ее ингибитора.* Этот фермент гидроксилирует аллопуринол, превращая его в *аллоксантин*, который остается прочно связанным с активным центром. Атом молибдена ксантиноксидазы при связывании аллоксантина остается в степени окисления +4, а не возвращается в степень окисления +6, как это происходит при нормальном каталитическом цикле. Механизм действия аллопуринола – пример *самоубийственного ингибирования*, когда фермент превращает какое-то соединение в мощный ингибитор, который сразу же инактивирует фермент.


Аллопуринол


Гипоксантин





Вскоре после введения аллопуринола синтез мочевой кислоты из гипоксантина и ксантина понижается. После введения аллопуринола концентрация гипоксантина и ксантина в сыворотке крови увеличивается, а концентрация мочевой кислоты падает. Образование мочекислых камней под действием аллопуринола почти полностью прекращается; при артритах состояние больных также несколько улучшается. Кроме того, *снижается общая скорость биосинтеза пуринов.* Ингибиторное действие аллопуринола зависит от его реакции с ФРПФ с образованием рибонуклеотида. Вследствие этого концентрация ФРПФ субстрата, лимитирующего скорость синтеза пуринов de novo, снижается. Кроме того, аллопуринолрибонуклеотид ингибирует превращение ФРПФ в фосфорибозиламин под действием амидофосфорибозилтрансферазы.

22.24. Синдром Леша - Нихана: членовредительство, умственное отставание и избыточное образование мочевой кислоты

Почти полное отсутствие гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы приводит к катастрофическим последствиям. Самое поразительное проявление этого врожденного нарушения метаболизма, которое называется *синдромом Леша – Нихана,* – *стремление больных к повреждению собственного тела.* В возрасте 2–3 лет больные дети начинают кусать свои пальцы и губы. Стремление к повреждению своего тела настолько опасно, что приходится защищать таких больных от самих себя, завязы-

вая им, например, руки марлевыми повязками. Кроме того, они проявляют повышенную агрессивность по отношению к другим людям, *страдают умственной отсталостью и судорогами.* Повышенная концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови вызывает образование камней уже в первые годы жизни, а через несколько лет появляются симптомы *подагры.* Болезнь наследуется как сцепленный с полом рецессивный признак.

Биохимическое следствие практически полного отсутствия гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы-*повышенное образование мочевой кислоты и повышенная концентрация ФРПФ.* Кроме того, существенно увеличивается скорость биосинтеза пуринов de novo. Связь между отсутствием трансферазы и странными неврологическими симптомами остается загадкой. Возможно, мозг в очень большой степени зависит от синтеза IMP и GMP из готовых остатков.

В норме активность гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы в мозгу выше, чем в любой другой ткани. В то же время активность амидотрансферазы, катализирующей решающую реакцию биосинтеза de novo, напротив, в мозгу сравнительно низка. Аллопуринол эффективно снижает синтез мочевой кислоты при синдроме Леша-Нихана. Однако на скорость синтеза пуринов de novo он не действует и не в состоянии подавить неврологические симптомы заболевания. В организме больных синдромом Леша-Нихана аллопуринол не превращается в рибонуклеотид, так как у них нет гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы. Поэтому введение аллопуринола не снижает концентрации ФРПФ у таких больных, и синтез пуринов de novo не подавляется.

Биохимический механизм синдрома Леша-Нихана показывает, что путь синтеза IMP и GMP из готовых остатков-не роскошь. Очевидно, он играет какую-то чрезвычайно важную, пока еще не совсем понятную роль. Кроме того, остается еще выяснить взаимосвязь между путями синтеза пуринов de novo и из готовых остатков. Наконец, синдром Леша-Нихана показывает, что аномальное поведение, такое, как повреждение собственного тела и крайняя агрессивность, могут быть обусловлены отсутствием всего лишь одного-единственного фермента. Это открытие было важным вкладом в последующее развитие психиатрии.

Заключение

В сборке пуринового кольца участвуют различные предшественники: глутамин, глицин, аспартат, метенилтетрагидрофолят, N^{10}-формилтетрагидрофолят и CO_2. Решающий этап синтеза пуриннуклеотидов de novo-образование 5-фосфорибозиламина из ФРПФ и глутамина. В процессе сборки пуриновое кольцо прикрепляется к рибозофосфату. В результате присоединения глицина, формилирования, аминирования и замыкания кольца образуется 5-аминоимидазолрибонуклеотид. Этот промежуточный продукт содержит полное пятичленное кольцо пуринового скелета. После присоединения CO_2, атома азота аспартата и формильной группы и замыкания кольца образуется пуриннуклеотид инозинат (IMP). AMP и GMP образуются из IMP. Пуринрибонуклеотиды могут также синтезироваться из готовых остатков; при этом синтезированное ранее основание вступает в реакцию непосредственно с ФРПФ. Ингибирование 5-фосфорибозил-1-пирофосфат-синтетазы конечным продуктом и глутамин: фосфорибозил-амидотрансферазы пуриннуклеотидами играет важную роль в регуляции их биосинтеза.

Пиримидиновое кольцо вначале собирается и лишь затем присоединяется к рибозофосфату с образованием пиримидиннуклеотида-в отличие от последовательности событий при синтезе пуриннуклеотидов de novo. Донором рибозофосфатного остатка и в этом случае служит ФРПФ. Синтез пиримидинового кольца начинается с образования карбамоиласпартата из карбамоилфосфата и аспартата. Эту реакцию катализирует аспартат-транскарбамоилаза. В результате реакций дегидратирования, циклизации и окисления возникает оротат. Он реагирует с ФРПФ, образуя оротидилат. Декарбоксилирование этого пиримидиннуклеотида дает UMP. Затем при аминировании UTP образуется CTP. Биосинтез пиримидинов в клетке *E.coli* регулируется путем ингибирования конечным продуктом аспартат-транскарбамоилазы-фермента, катализирующего решающий этап. CTP ингибирует фермент, а ATP его стимулирует. Аспартат-транскарбамоилаза состоит из регулярной и каталитической субъединиц, которые можно разделить.

В клетках млекопитающих все три фермента, катализирующие первые три реакции биосинтеза пиримидинов, содержатся в виде единой полипептидной цепи.

Предшественники ДНК – дезоксирибонуклеотиды образуются путем восстановления рибонуклеозиддифосфатов. Эти превращения катализирует рибонуклеотид-редуктаза. В каталитических центрах этого фермента тиоредоксин и глутаредоксин переносят электроны с NADPH на сульфгидрильные группы. dTMP образуется путем метилирования dUMP. Донор одноуглеродного фрагмента и электронов в этой реакции – N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолят, который превращается в дигидрофолят. Тетрагидрофолят в свою очередь регенерируется путем восстановления дигидрофолята. Дигидрофолят-редуктаза, катализирующая эту реакцию, ингибируется аналогами фолата, например аминоптерином или аметоптерином (метотрексатом). Эти соединения используются как противоопухолевые препараты.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Книги и обзоры

Kornberg A., 1980. DNA Replication, Freeman. (В гл. 2 прекрасно изложен биосинтез предшественников ДНК.)

Henderson J. F., Paterson A. R. P., 1973. Nucleotide Metabolism: An Introduction, Academic Press.

Elliott K., Fitzsimons D. W. (eds.), 1977. Purine and Pyrimidine Metabolism, Ciba Foundation Symposium, 48.

Blakley R. L., 1969. The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, North-Holland.

Walsh C., 1979. Enzymatic Reaction Mechanisms, Freeman. (Четко и ясно описаны некоторые важные механизмы реакций биосинтеза нуклеотидов. См. в гл. 5 обсуждение трансаминаз. Гл. 13 посвящена ксантиноксидазе, гл. 25 – переносу одноуглеродных фрагментов.)

Kelley W. N., Weiner I. M. (eds.), 1978. Uric Acid, Springer-Verlag. (Сборник важных обзоров по биохимии и физиологии мочевой кислоты, подагре и метаболизму пуринов.)

Jones M. E., 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes and regulation of UMP biosynthesis, Ann. Rev. Biochem., **49**, 253–279.

Аспартат-транскарбамоилаза

Kantrowitz E. V., Pastra-Landis S. C., Lipscomb W. N., 1980. *E.coli* aspartate transcarbamylase. Part II: Structure and allosteric interactions, Trends Biochem. Sci., **5**, 150–153.

Gerhart J. C., 1970. A discussion of the regulatory properties of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*, Curr. Top. Cell Regul., **2**, 275–325.

Jacobson G. R., Stark G. R., 1973. Aspartate transcarbamylases. In: Boyer P. D. (ed.), The Enzymes (3rd ed.), vol. 9, pp. 225–308, Academic Press.

Monaco H. L., Crawford J. L., Lipscomb W. N., 1978. Three-dimensional structures of aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli and of its complex with cytidine triphosphate, Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 5276–5280.

Hensley P., Schachman H. K., 1979. Communication between dissimilar subunits in aspartate transcarbamoylase: effect of inhibitor and activator on the conformation of the catalytic polypeptide chains, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 3732–3736.

Рибонуклеозиддифосфат-редуктаза

Thelander L., Reichard P., 1979. Reduction of ribonucleotides, Ann. Rev. Biochem., **48**, 133–158.

Holmgren A., Soderberg B. O., Eklund H., Brändén C.-L., 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli thioredoxin-S_2 to 2,8 Å resolution, Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 2305–2309.

Holmgren A., 1976. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione, Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 2275–2279. (Открытие новой глутаредоксиновой системы для восстановления рибонуклеотидредуктазы.)

Другие ферменты

Coleman P. F., Suttle D. P., Stark G. R., 1977. Purification from hamster cells of the multifunctional protein that initiates de novo synthesis of pyrimidine nucleotides, J. Biol. Chem., **252**, 6379–6385.

Pagolotti A. L., Jr., Santi D. V., 1977. The catalytic mechanism of thymidylate synthetase, Bioorg. Chem., **1**, 277–311.

Matthews D. A., Alden R. A., Bolin J. T., Freer S. T., Hamlin R., Xuong N., Kraut J., Williams M., Poe M., Hoogsteen K., 1977. Dihydrofolate reductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate, Science, **197**, 452–455.

Benkovic S. J., 1980. On the mechanism of action of folate- and biopterin-requiring enzymes, Ann. Rev. Biochem., **49**, 227–251.

Врожденные ошибки метаболизма

Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds.), 1978. The metabolic Basis of Inherited Diseases (4th ed.), McGraw-Hill. (Статьи по врожденным ошибкам пуринового и пиримидинового метаболизма превосходны. См. статьи, посвященные подагре и синдрому Леша – Нихана (Wyngaarden J. B., Kelley W. B.), оротовой ацидурии (Kelley W. N., Smith L. H.) и ксантинурии (Wyngaarden J. B.).

Seegmiller J. E., 1980. In: Bundy P. K., and Rosenberg L. E. (eds.), Metabolic Control and Disease (8th ed.), pp. 777–937. Saunders. (Замечательный обзор работ о нарушениях пуринового и пиримидинового метаболизма.)

Вопросы и задачи

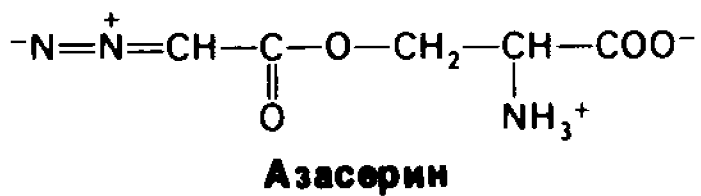
1. Напишите сбалансированное уравнение синтеза ФРПФ из глюкозы через окислительную ветвь пентозофосфатного пути.

2. Напишите сбалансированное уравнение синтеза оротата из глутамина, CO_2 и аспартата.

3. Какое соединение выступает в качестве активированного предшественника при синтезе следующих соединений:

а) фосфорибозиламина,
б) карбамоиласпартата,
в) оротидилата (из оротата),
г) рибонуклеотида никотиновой кислоты,
д) фосфорибозилантранилата?

4. Амидотрансферазы ингибируются аналогом глутамина антибиотиком азасерином (О-диазоацетил-L-серин):

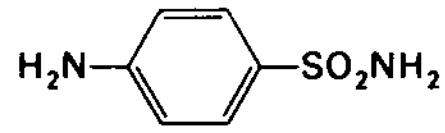


Азасерин

Какие промежуточные соединения биосинтеза пуринов будут накапливаться в клетках, обработанных азасерином?

5. Напишите сбалансированное уравнение синтеза dTMP из dUMP, сопряженное с превращением серина в глицин.

6. Рост бактерий ингибируется сульфаниламидами и другими родственными сульфопрепаратами. Одновременно накапливается рибонуклеотид 5-аминоимидазол-4-карбоксамида. Это ингибирование можно обратить путем добавления *п*-аминобензоата:



Сульфаниламид

Предложите механизм ингибирующего действия сульфаниламида.

7. Назовите основные биосинтетические реакции, в которых участвует ФРПФ.

8. Карбамоилфосфат-синтаза *E.coli* состоит из малой субъединицы (40 кДа) и большой субъединицы (130 кДа). Очищенная малая субъединица обладает глутаминазной активностью, а очищенная большая субъединица может синтезировать карбамоилфосфат из NH_3, но не из глутамина. Кроме того, выделенная малая субъединица в присутствии бикарбоната проявляет АТРазную активность. Исходя из активностей, которыми обладают выделенные субъединицы, предложите вероятный механизм реакции, катализируемой интактным ферментом.

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E., Biochemistry, A Problems Approach, Benjamin, 1974, ch. 15.

ГЛАВА 23

Интеграция метаболизма

Каким образом координируется сложная сеть метаболических реакций, чтобы она удовлетворяла потребностям целого организма? В этой главе мы познакомимся с некоторыми основополагающими принципами интеграции метаболизма у млекопитающих. Мы начнем с того, что вкратце подытожим стратегию метаболизма и основные механизмы его регуляции. Затем взаимосвязь различных метаболических путей будет рассмотрена с помощью анализа потока вещества на трех важнейших перекрестках: глюкозо-6-фосфат, пируват и ацетил-СоА. После этого будут обсуждены различия в картине метаболизма в мозге, мышцах, жировой ткани и печени. Далее мы перейдем к основным гормональным регуляторам энергетического метаболизма – инсулину, глюкагону, адреналину и норадреналину. Вслед за этим мы обратимся к самому важному аспекту метаболизма – регуляции концентрации глюкозы в крови. В последней части главы рассматривается замечательное явление приспособления метаболизма к продолжительному голоданию.

23.1. Стратегия метаболизма: основные положения

Как уже говорилось в гл. 11, стратегические цели метаболизма состоят в генерировании АТР, восстановительной способности и строительных блоков для биосинтетических реакций. Рассмотрим вкратце эти аспекты.

1. *АТР – универсальная энергетическая валюта.* Высокий потенциал переноса фосфатной группы у АТР позволяет ему служить источником энергии для мышечного сокращения, активного транспорта, усиления сигналов и биосинтетических процессов. Гидролиз одной молекулы АТР изменяет равновесное соотношение концентраций веществ, вступающих в сопряженную реакцию, и ее продуктов примерно в 10^8 раз. Таким образом, термодинамически невыгодную последовательность реакций можно сделать выгодной, если осуществить ее сопряжение с гидролизом достаточного числа молекул АТР. Например, на превращение мевалоната в изопентенилпирофосфат, активированный пятиуглеродный предшественник синтеза холестерола, затрачивается три молекулы АТР.

2. *АТР образуется при окислении молекул, используемых в качестве источников энергии, таких, как глюкоза, жирные кислоты*



Рис. 23.1. Электронная микрофотография клеток печени. Печень играет ключевую роль в интеграции метаболизма. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ann Hubbard.)

и аминокислоты. Общий промежуточный продукт большинства окислительных реакций – ацетил-СоА. Ацетильная группа полностью окисляется до CO_2 в ходе цикла трикарбоновых кислот с одновременным образованием NADH и $FADH_2$. Затем эти переносчики отдают свои высокоэнергетические электроны в дыхательную цепь. Электроны проходят по дыхательной цепи до O_2, что приводит к перекачиванию протонов через внутреннюю мембрану митохондрий. Возникающий в результате градиент протонов используется для синтеза АТР. Еще один процесс, продуцирующий АТР,– гликолиз, однако он дает гораздо меньше АТР, чем окислительное фосфорилирование. Окисление глюкозы до пирувата дает только две молекулы АТР, тогда как при полном окислении глюкозы до CO_2 образуется 36 молекул АТР. Однако в отличие от окислительного фосфорилирования, требующего постоянного поступления O_2, гликолиз может в течение непродолжительного времени протекать с высокой интенсивностью в анаэробных условиях.

3. *NADPH – основной донор электронов в восстановительных реакциях биосинтеза.* В большинстве биосинтетических реакций продукты находятся в более восстановленном состоянии, чем предшественники, так что помимо АТР необходим восстановительный эквивалент. Высокоэнергетические электроны, необходимые для поддержания этих реакций, обычно поставляет NADPH. Например, при биосинтезе жирных кислот оксогруппа присоединяемого двухуглеродного остатка восстанавливается до метиленовой группы за счет четырех электронов двух молекул NADPH. Активация O_2 под действием оксигеназ со смешанной функцией, катализирующих реакции гидроксилирования, также иллюстрирует универсальную роль NADPH в качестве восстановителя. Необходимое количество NADPH поставляет большей частью пентозофосфатный путь. Кроме того, значительное количество этого переносчика электронов образуется под действием «яблочного» фермента (малатдегидрогеназы, декарбоксилирующей) при переносе ацетил-СоА из митохондрий в цитоплазму для синтеза жирных кислот.

4. *Крупные молекулы клетки строятся из сравнительно небольшого числа блоков.* Все огромное разнообразие молекул клетки синтезируется из гораздо меньшего числа различных предшественников. Метаболические реакции, в ходе которых образуются АТР и NADPH, выполняют и другую задачу – поставляют строительные блоки для синтеза более сложных молекул. Например, дигидроксиацетонфосфат, образующийся при гликолизе, превращается в глицероловый скелет фосфатидилхолина и других фосфоацилглицеролов. Еще один промежуточный продукт гликолиза, фосфоенолпируват, участвует в построении углеродного скелета ароматических аминокислот. Ацетил-СоА, общий промежуточный продукт расщепления большинства молекул – источ-

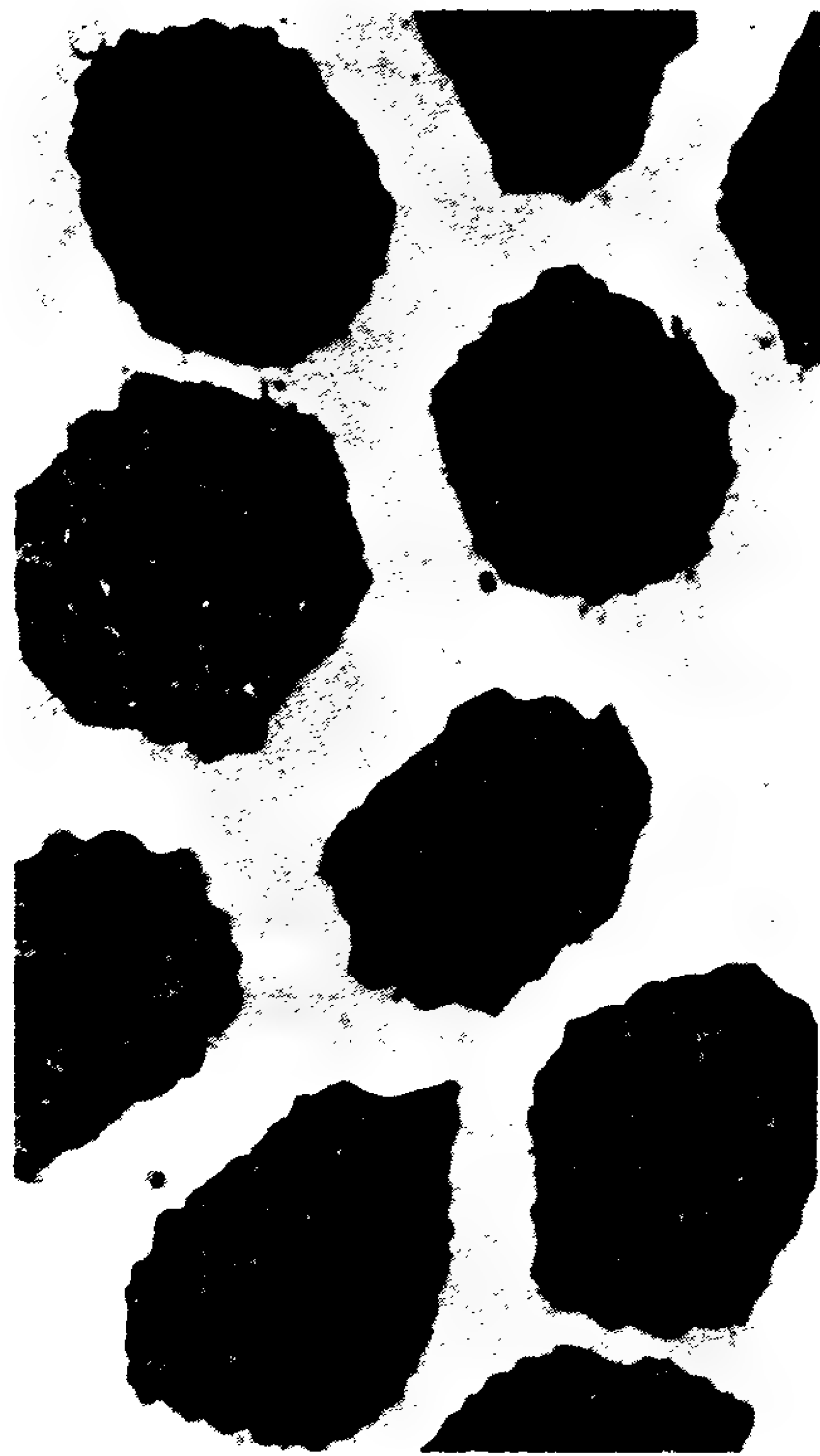


Рис. 23.2. На этой электронной микрофотографии видны многочисленные митохондрии во внутреннем сегменте палочек сетчатки. Эти фоторецепторные клетки образуют большое количество АТР и сильно зависят от постоянного поступления O_2. (Печатается с любезного разрешения д-ра Michael Hogan.)

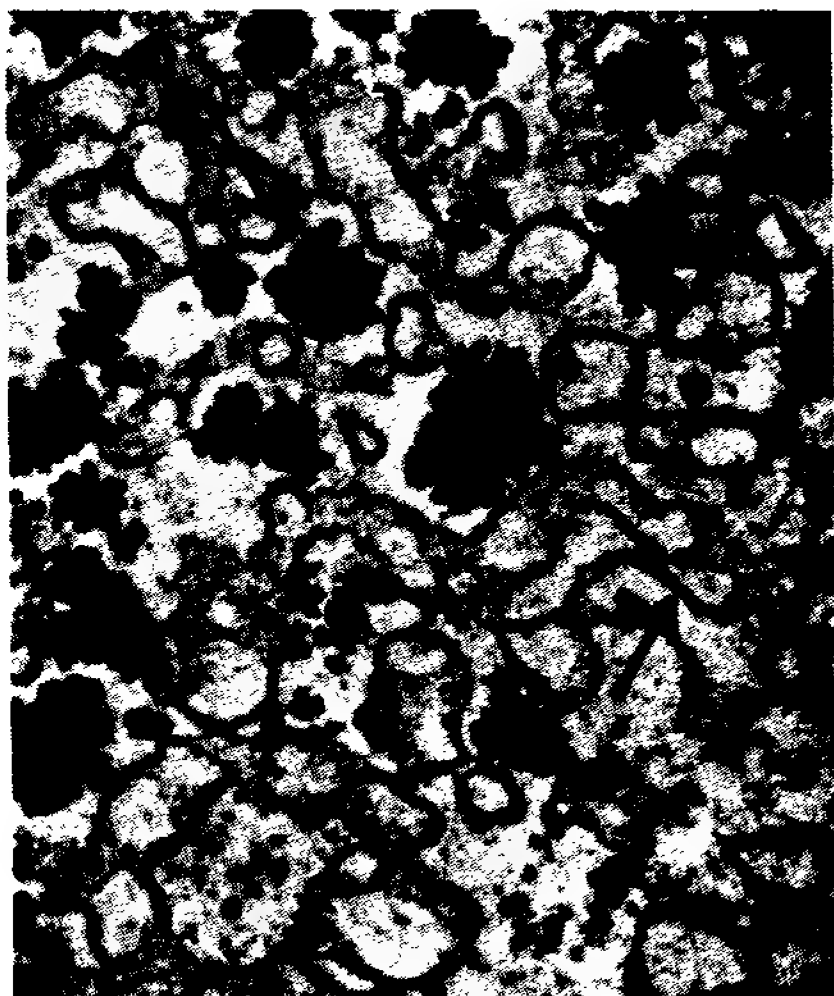


Рис. 23.3. Электронная микрофотография части клетки печени. Стрелка наверху указывает на частицу гликогена, стрелка внизу – на гладкий эндоплазматический ретикулум. В гладком эндоплазматическом ретикулуме протекают реакции гидроксилирования, катализируемые оксигеназами со смешанными функциями. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

ников энергии, поставляет двухуглеродные фрагменты для самых разнообразных биосинтетических реакций. Сукцинил-СоА, образующийся в цикле трикарбоновых кислот,– один из предшественников порфиринов. Рибозо-5-фосфат, который образуется наряду с NADPH в пентозофосфатном пути,– источник остатка сахара, входящего в состав нуклеотидов. Кроме того, многие биосинтетические реакции нуждаются в одноуглеродных фрагментах. Тетрагидрофолят – источник таких фрагментов, находящихся на различных уровнях окисления. Образование этих производных, равно как и основного донора метильных групп S-аденозилметионина, тесно связано с метаболизмом аминокислот. Таким образом, главные метаболические пути выполняют и анаболические, и катаболические функции.

5. *Биосинтез и расщепление почти всегда осуществляются различными путями.* Например, путь синтеза жирных кислот отличается от пути их расщепления. Точно так же гликоген синтезируется и расщепляется в результате различных последовательностей реакций. Благодаря такому разделению пути синтеза и расщепления постоянно оказываются термодинамически выгодными. Чтобы какой-либо путь биосинтеза был экзергоническим, он должен быть сопряжен с гидролизом достаточного количества молекул АТР. Например, на превращение пирувата в глюкозу в процессе глюконеогенеза затрачивается на четыре высокоэнергетические связи ~ Р больше, чем образуется в процессе превращения глюкозы в пируват в ходе гликолиза. Эти четыре дополнительные связи ~ Р обусловливают экзергоничность глюконеогенеза при любых существующих в клетке условиях. *Принципиально важная особенность метаболических путей состоит в том, что их скорость определяется не законом действующих масс, а активностью ключевых ферментов.* Разделение путей биосинтеза и расщепления имеет особенно важное значение для эффективной регуляции метаболизма.

23.2. Повторяющиеся мотивы в механизмах регуляции метаболизма

Сложная сеть реакций, протекающих в клетке, тонко регулируется и координируется. Существует несколько способов регуляции метаболических процессов.

1. *Аллостерические взаимодействия.* Поток молекул в большинстве метаболических путей определяется прежде всего количеством и активностью определенных ферментов, а не наличием субстрата. Практически необратимые реакции – потенциальные регуляторные участки. Первая необратимая реакция какого-либо метаболического пути (решающий этап) обычно служит важным элементом контроля. Ферменты, катализирующие решающие этапы, регулируются аллостерически, как, например, фосфофруктокиназа при гликолизе или ацетил-СоА – карбоксилаза при синтезе жирных кислот. Кроме того, последующие необратимые реакции того же метаболического пути также могут регулироваться. Аллостерические взаимодействия позволяют таким ферментам распознавать разнообразные сигналы и интегрировать полученную информацию.

2. *Ковалентная модификация.* Некоторые регуляторные ферменты контролируются не только аллостерически, но и с помощью ковалентной модификации. Например, фосфорилирование повышает каталитическую активность гликоген-фосфорилазы и снижает активность гликоген-синтазы. Эти ковалентные модификации катализируются особыми ферментами. Еще один пример – глутамин-синтетаза, активность которой снижается при ковалентном присоединении остатка AMP. И в этом случае присоединение и отщепление модифицирующей группы катализируется специальными ферментами. Зачем же используется ковалентная модификация наряду с нековалентной аллостерической регуляцией? Ковалентная модификация ключевых ферментов метаболизма – заключительная стадия каскада реакций, усиливающего сигнал. Благодаря этому метаболический путь может быстро включаться и выключаться под действием очень слабых сигналов, как это показано на примере стимулирующего влияния адреналина на расщепление гликогена.

3. *Концентрации ферментов.* Количество ферментов, равно как и их активность, регулируется. Скорости синтеза и деградации некоторых регуляторных ферментов регулируются гормональными факторами.

4. *Компартментация.* Общая картина метаболизма в разных пространственно разграниченных участках (компартментах) эукариотических клеток сильно различается. Гликолиз, пентозофосфатный путь и синтез жирных кислот происходят в цитозоле, а окисление жирных кислот, цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование – в митохондриях. Некоторые процессы, например глюконеогенез и синтез мочевины, зависят от взаимодействия реакций, протекающих в обоих компартментах. Судьба некоторых молекул определяется тем, где они находятся – в цитозоле или в митохондриях. Это делает возможным регуляцию их потока через внутреннюю митохондриальную мембрану. Например, жирные кислоты, будучи перенесенными в митохондрии, быстро расщепляются, тогда как в цитоплазме они этерифицируются или выделяются во внеклеточное пространство. Напомним, что жирные кислоты с длинной цепью переносятся внутрь митохондриального матрикса в виде эфиров карнитина – переносчика, благодаря

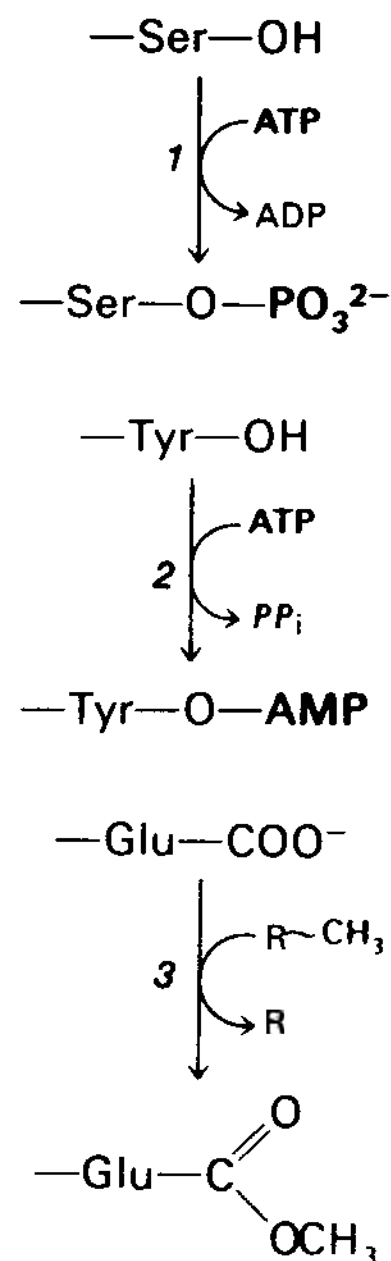


Рис. 23.4. Примеры обратимой ковалентной модификации белков: *1* – фосфорилирование; *2* – аденилирование; *3* – метилирование.

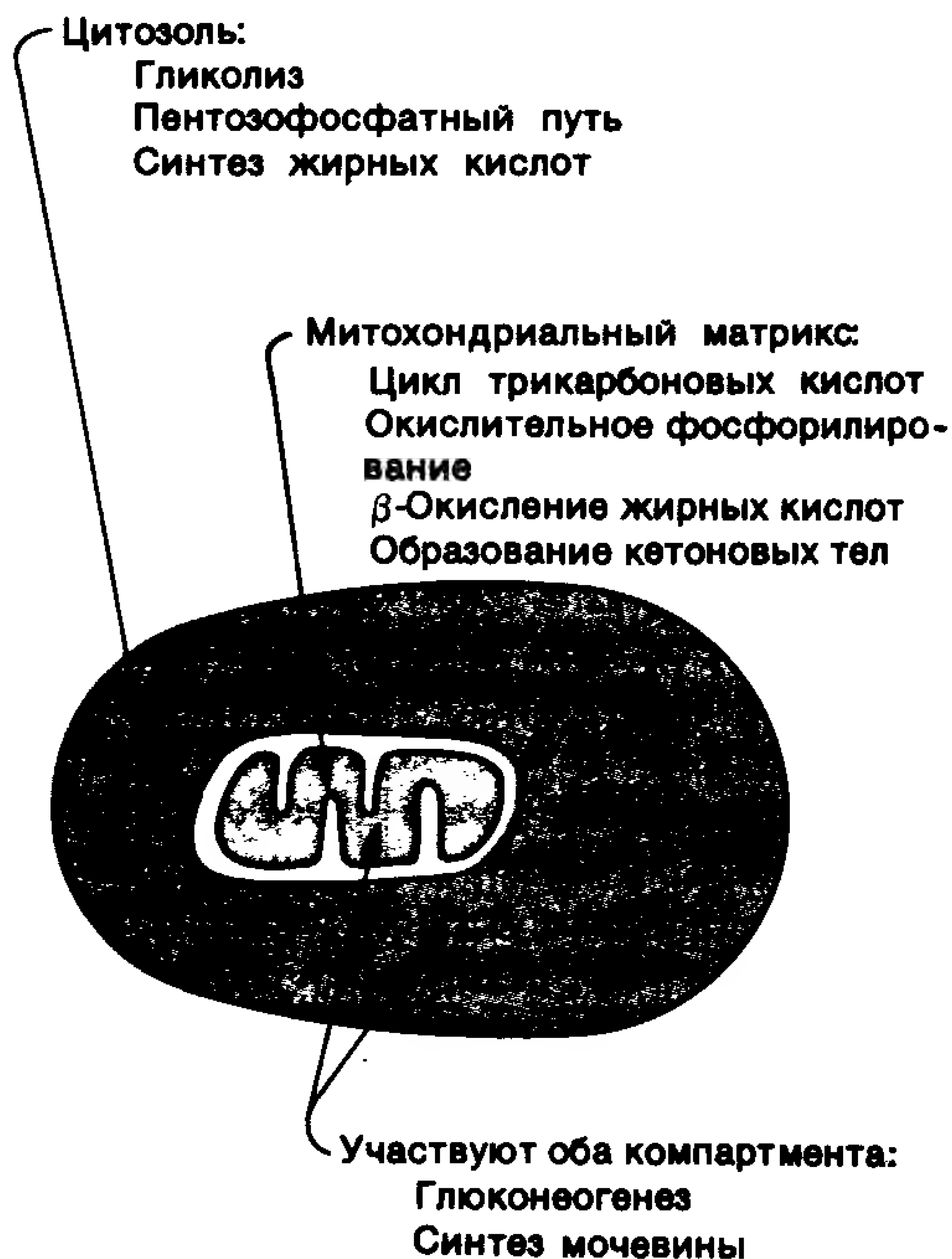


Рис. 23.5. Компартментация основных путей метаболизма.

Эффект Пастера – ингибирование гликолиза дыханием, открытое Луи Пастером при исследовании дрожжевого брожения. В аэробных условиях поглощение углеводов примерно в 7 раз ниже, чем в анаэробных. Пастеровский эффект можно объяснить ингибированием фосфофруктокиназы цитратом и ATP.

которому эти молекулы оказываются способными проходить сквозь внутреннюю митохондриальную мембрану.

5. *Метаболическая специализация органов.* У высших эукариот регуляция более эффективна, поскольку на нее большое влияние оказывает наличие органов со специфической метаболической регуляцией.

23.3. Основные метаболические пути и регуляторные этапы

Рассмотрим роль основных путей метаболизма и важнейшие этапы, на которых осуществляется регуляция.

1. *Гликолиз.* В результате этой последовательности реакций, протекающих в цитозоле, одна молекула глюкозы превращается в две молекулы пирувата. При этом образуются две молекулы ATP и две молекулы NADH. Для того чтобы реакции гликолиза продолжались непрерывно, необходимо регенерировать NAD^+, который расходуется в реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфат—дегидрогеназой. В анаэробных условиях, например в активно работающей скелетной мышце, это достигается восстановлением пирувата до лактата. В аэробных условиях регенерирование NAD^+ осуществляется по-иному – путем переноса электронов от NADH к O_2 по цепи переносчиков. Гликолиз выполняет две основные функции: расщепляет глюкозу с образованием ATP и поставляет углеродные скелеты молекул для биосинтетических реакций. Скорость превращения глюкозы в пируват регулируется в соответствии с этими двумя задачами. *Важнейший регулируемый этап – фосфофруктокиназа, катализирующая решающую реакцию гликолиза.* Высокая концентрация ATP ингибирует фосфофруктокиназу. Ингибирующее действие ATP усиливается в присутствии цитрата и подавляется AMP. Таким образом, скорость гликолиза определяется потребностью в ATP, о которой сигнализирует соотношение ATP/AMP, и потребностью в строительных блоках, о чем сигнализирует концентрация цитрата.

2. *Цикл трикарбоновых кислот.* Это заключительный общий путь окисления молекул – источников энергии: углеводов, аминокислот и жирных кислот. Он функционирует в митохондриях. Богатые энергией молекулы вступают в цикл главным образом в виде ацетил-CoA. При полном окислении одного ацетильного остатка образуются одна молекула GTP, три молекулы NADH и одна молекула $FADH_2$. Затем четыре пары электронов переносятся на O_2 по цепи переноса электронов; в результате создается градиент концентрации протонов, который обеспечивает синтез одиннадцати молекул ATP. NADH и $FADH_2$ окисляются только в том случае, если ADP одновременно фосфорилируется до ATP. *Это тесное сопряжение называется дыхательным контролем; оно обеспечивает соответствие скорости реакций цикла трикарбоновых кислот потребности в ATP.* Кроме того, избыток ATP снижает активность трех ферментов цикла – цитрат-синтазы, изоцитрат-дегидрогеназы и α-оксоглутарат-дегидрогеназы. Помимо этого, цикл трикарбоновых кислот играет важную роль в анаболизме. Он обеспечивает синтез некоторых промежуточных продуктов, например сукцинил-CoA, служащего источником части углеродного скелета порфиринов.

3. *Пентозофосфатный путь.* Этот ряд реакций, протекающих в цитозоле, выполняет две функции: генерирование NADPH

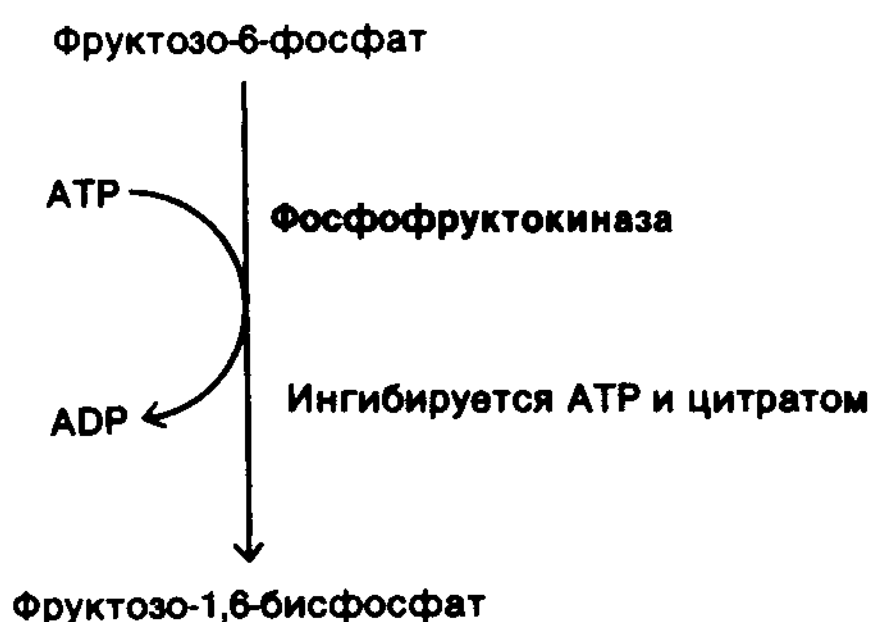


Рис. 23.6. Фосфофруктокиназа – ключевой фермент регуляции гликолиза.

для восстановительных реакций биосинтеза и образование рибозо-5-фосфата для синтеза нуклеотидов. Две молекулы NADPH образуются при превращении глюкозо-6-фосфата в рибозо-5-фосфат. Решающий этап данного пути – дегидрирование глюкозо-6-фосфата. Эта реакция регулируется концентрацией акцептора электронов $NADP^+$. Лишняя фосфорильная группа в NADPH – ярлычок, отличающий его от NADH. Благодаря этому различию в одном и том же компартменте может поддерживаться высокое соотношение $[NADPH]/[NADP^+]$ и низкое соотношение $[NADH]/[NAD^+]$. Следовательно, восстановительные реакции биосинтеза и гликолиз могут протекать одновременно с высокой скоростью.

4. *Глюконеогенез.* Глюкоза может синтезироваться в печени и почках из предшественников не углеводной природы, таких, как лактат, глицерол и аминокислоты. Различные вещества вступают в реакции этого пути главным образом через пируват, который карбоксилируется в митохондриях с образованием оксалоацатата. Затем оксалоацетат декарбоксилируется и фосфорилируется в цитозоле с образованием фосфоенолпирувата. Еще две гидролитические реакции, характерные для глюконеогенеза, идут в обход необратимых стадий гликолиза. *Глюконеогенез и гликолиз обычно взаимно скоординированы таким образом, что в то время, как один путь бездействует, второй весьма активен.* Например, AMP ингибирует, а цитрат активирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу – ключевой фермент глюконеогенеза, тогда как на фосфофруктокиназу, определяющую скорость гликолиза, эти молекулы оказывают обратное действие.

5. *Синтез и расщепление гликогена.* Гликоген – легко мобилизуемая форма запасания энергии. Он представляет собой разветвленный полимер остатков глюкозы. Активированный промежуточный продукт синтеза гликогена – UDP-глюкоза, которая образуется из глюкозо-1-фосфата и UTP. Гликоген-синтаза катализирует перенос глюкозного остатка с UDP-глюкозы на концевую гидроксильную группу растущей цепи. Расщепление гликогена идет другим путем. Фосфорилаза катализирует расщепление гликогена ортофосфатом с образованием глюкозо-1-фосфата. *Синтез и расщепление гликогена координируются с по-*

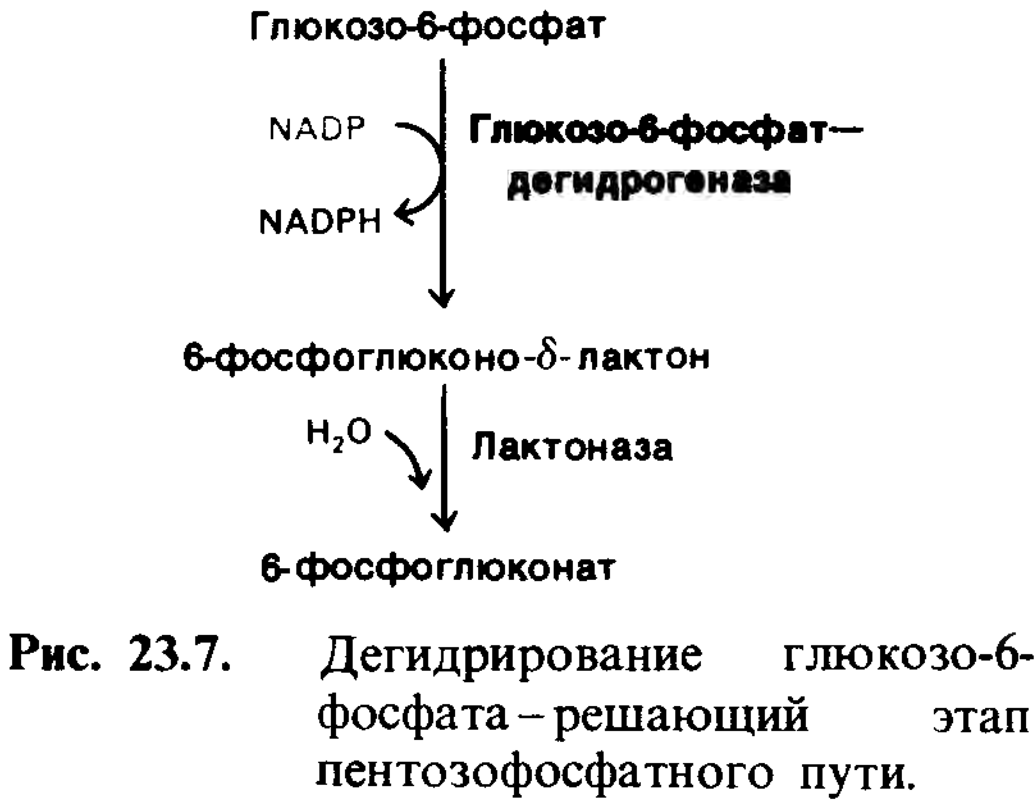


Рис. 23.7. Дегидрирование глюкозо-6-фосфата – решающий этап пентозофосфатного пути.

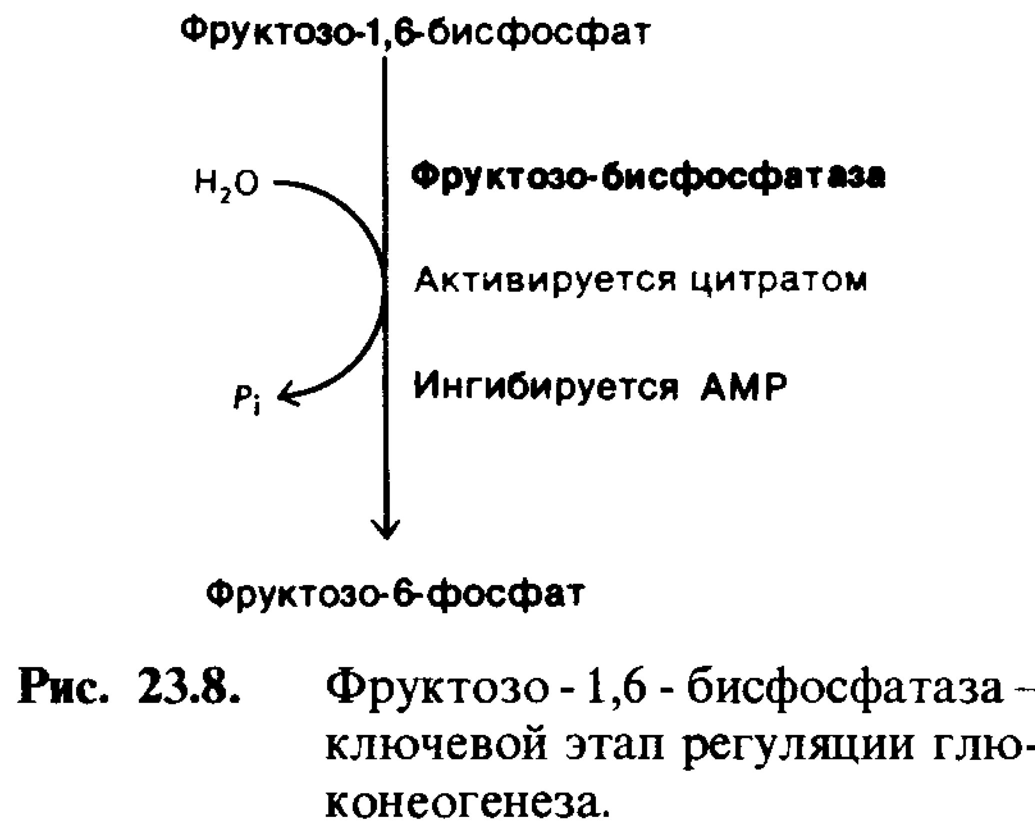


Рис. 23.8. Фруктозо-1,6-бисфосфатаза – ключевой этап регуляции глюконеогенеза.

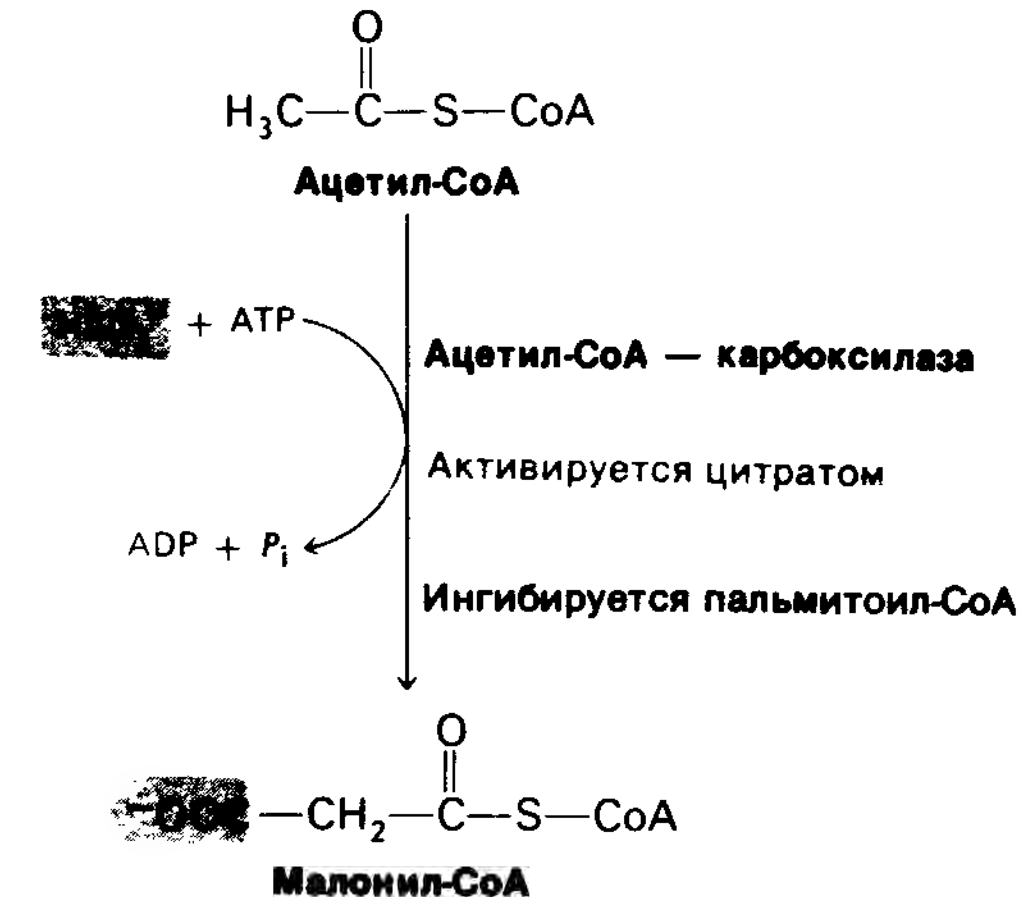


Рис. 23.9. Ацетил-CoA – карбоксилаза – ключевой регуляторный участок синтеза жирных кислот.

мощью усиливающего каскада, запускаемого гормоном, так что когда неактивна гликоген-синтаза, активна фосфорилаза, и наоборот. Эти ферменты регулируются посредством фосфорилирования и нековалентных аллостерических взаимодействий (разд. 16.15).

6. *Синтез и расщепление жирных кислот.* Жирные кислоты синтезируются в цитозоле путем присоединения двухуглеродных остатков к растущей цепи, закрепленной на ацилпереносящем белке. Активированный промежуточный продукт малонил-СоА образуется путем карбоксилирования ацетил-СоА. Ацетильные группы переносятся из митохондрий в цитозоль с помощью цитрата. Этот челночный механизм обеспечивает генерирование части NADPH, необходимого для восстановления присоединенного ацетильного остатка. Остальной NADPH поступает из пентозофосфатного пути. *Цитрат стимулирует ацетил-СоА—карбоксилазу, фермент, катализирующий решающий этап. Если в клетке имеется избыток АТР и ацетил-СоА, то концентрация цитрата увеличивается, и это ускоряет синтез жирных кислот.* Расщепление жирных кислот происходит другим путем и в другом компартменте. Они расщепляются до ацетил-СоА в митохондриальном матриксе путем β-окисления. Затем, если поступает достаточное количество оксалоацетата, ацетил-СоА вступает в цикл трикарбоновых кислот. В противном случае ацетил-СоА может превращаться в кетоновые тела. $FADH_2$ и NADH, образующиеся в результате β-окисления, отдают свои электроны O_2 через цепь переноса электронов. Как и цикл трикарбоновых кислот, β-окисление может протекать только при условии постоянного регенерирования NAD^+ и FAD. *Следовательно, скорость расщепления жирных кислот также связана с потребностью клетки в АТР.*

23.4. Ключевые соединения: глюкозо-6-фосфат, пируват и ацетил-СоА

Факторы, определяющие потоки молекул в метаболических путях, можно описать подробнее, проанализировав три важнейших метаболита, на уровне которых происходит пересечение метаболических путей: глюкозо-6-фосфат, пируват и ацтил-СоА. Каждое из этих соединений имеет несколько альтернативных путей превращений.

1. *Глюкозо-6-фосфат.* Глюкоза, поступающая в клетку, быстро фосфорилируется до глюкозо-6-фосфата, который может затем запасаться в виде гликогена, расщепляться до пирувата или превращаться в рибозо-5-фосфат (рис. 23.10). Гликоген образуется в условиях избытка глюкозо-6-фосфата и АТР. Если же АТР и углеродные скелеты молекул расходуются на биосинтетические реакции, глюкозо-6-фосфат вступает в реакции гликолитического пути. Таким образом, превращение глюкозо-6-фосфата в пируват может быть как анаболическим, так и катаболическим процессом. Третий вариант использования глюкозо-6-фосфата, пентозофосфатный путь, поставляет NADPH для восстановительных реакций биосинтеза и рибозо-5-фосфат для синтеза нуклеотидов. Относительные количества этих двух продуктов могут варьировать в очень широких пределах благодаря исключительной гибкости данной последовательности реакций, как это уже обсуждалось выше (разд. 15.6). Глюкозо-6-фосфат может образовываться либо при мобилизации гликогена, либо из пирувата и других неуглеводных предшественников в результате реакций глюконеогенеза. Чуть ниже мы увидим, что низкая концентрация глюкозы в крови стимулирует как гликогенолиз, так и глюконеогенез *в печени и почках. Эти органы отличаются тем, что содержат глюкозо-6-фосфатазу, благодаря которой глюкоза может выделяться в кровь.*

2. *Пируват.* Эта трехуглеродная α-оксокислота также лежит в точке пересечения главных метаболических путей (рис. 23.11). Пируват образуется главным образом из глюкозо-6-фосфата, лактата и аланина. Лактат – просто восстановленная форма пиру-

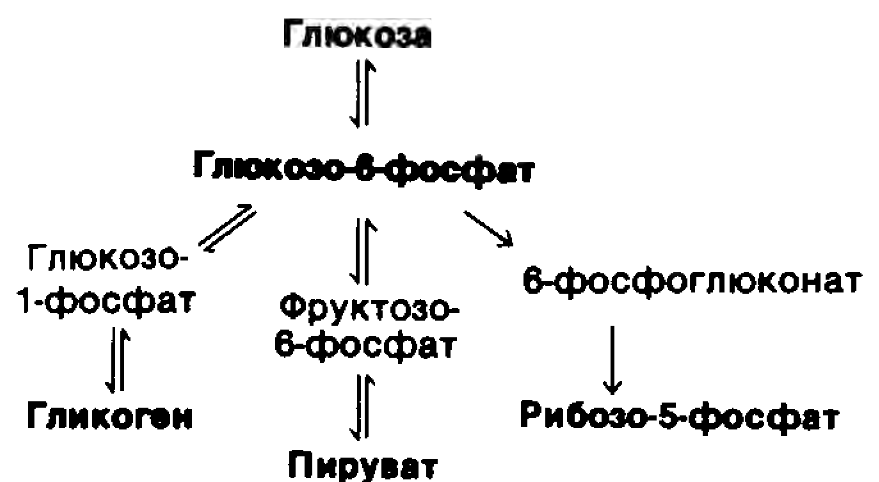


Рис. 23.10. Метаболические превращения глюкозо-6-фосфата.

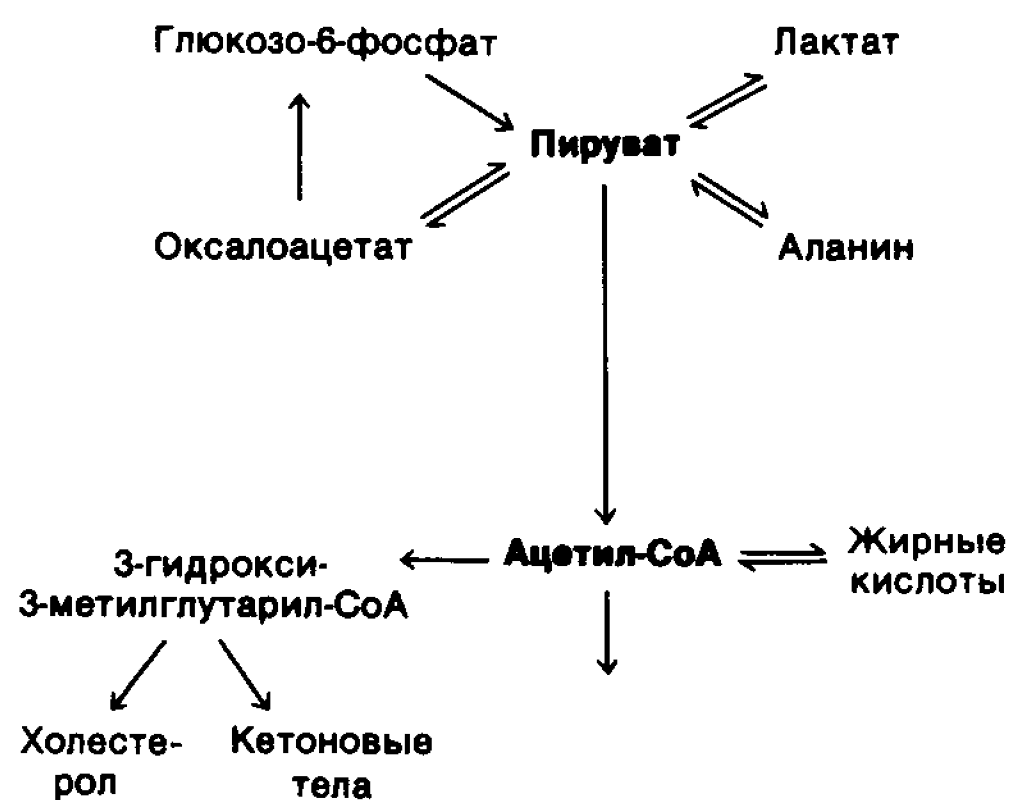


Рис. 23.11. Метаболические превращения пирувата и ацетил-СоА.

вата. Пируват легко восстанавливается под действием лактат-дегидрогеназы. Данная реакция обеспечивает регенерирование NAD^+, что позволяет гликолизу непрерывно протекать в анаэробных условиях. Лактат, образующийся в активных тканях, например в сокращающихся мышцах, впоследствии снова окисляется до пирувата. Этот процесс идет главным образом в печени. Смысл этих превращений состоит в том, что они позволяют выиграть время и перемещают часть отходов метаболизма активно работающей мышцы в печень. Еще одна легко обратимая реакция, идущая в цитозоле,- трансаминирование α-оксокислоты пирувата с образованием соответствующей аминокислоты - аланина. Таким путем некоторые аминокислоты могут вступать в реакции основных метаболических путей. Наряду с этим, некоторые аминокислоты могут таким образом синтезироваться из углеводных предшественников. Следовательно, трансаминирование - основная реакция, связывающая метаболизм аминокислот и углеводов. Третий способ использования пирувата - его карбоксилирование внутри митохондрий с образованием оксалоацетата. Эта реакция и последующее превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват идут в обход необратимой стадии гликолиза и позволяют синтезировать глюкозу из пирувата. Кроме того, карбоксилирование пирувата играет важную роль в пополнении промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот. Активация пируват-карбоксилазы под действием ацетил-СоА усиливает синтез оксалоацетата, когда цикл трикарбоновых кислот замедляется из-за истощения этого метаболита. С другой стороны, если цикл трикарбоновых кислот ингибируется избытком АТР, оксалоацетат, синтезированный из пирувата, включается в последовательность реакций глюконеогенеза. Четвертая важная реакция, в которую вступает пируват,- окислительное декарбоксилирование с образованием ацетил-СоА. Эта необратимая реакция, протекающая в митохондриях,- решающий этап метаболизма: она направляет атомы углерода углеводов и аминокислот на путь окисления в цикле трикарбоновых кислот или синтеза липидов. Комплекс пируват-дегидрогеназы, катализирующий эту необратимую стадию, строго регулируется многочисленными аллостерическими взаимодействиями и ковалентными модификациями. Пируват превращается в ацетил-СоА с высокой скоростью, только если клетке необходимы АТР или двухуглеродные фрагменты для синтеза липидов.

3. **Ацетил-СоА.** Основные источники этого активированного двухуглеродного фрагмента - окислительное декарбоксилирование пирувата и β-окисление жирных кислот (рис. 23.11). Кроме того, ацетил-СоА образуется из кетогенных аминокислот.

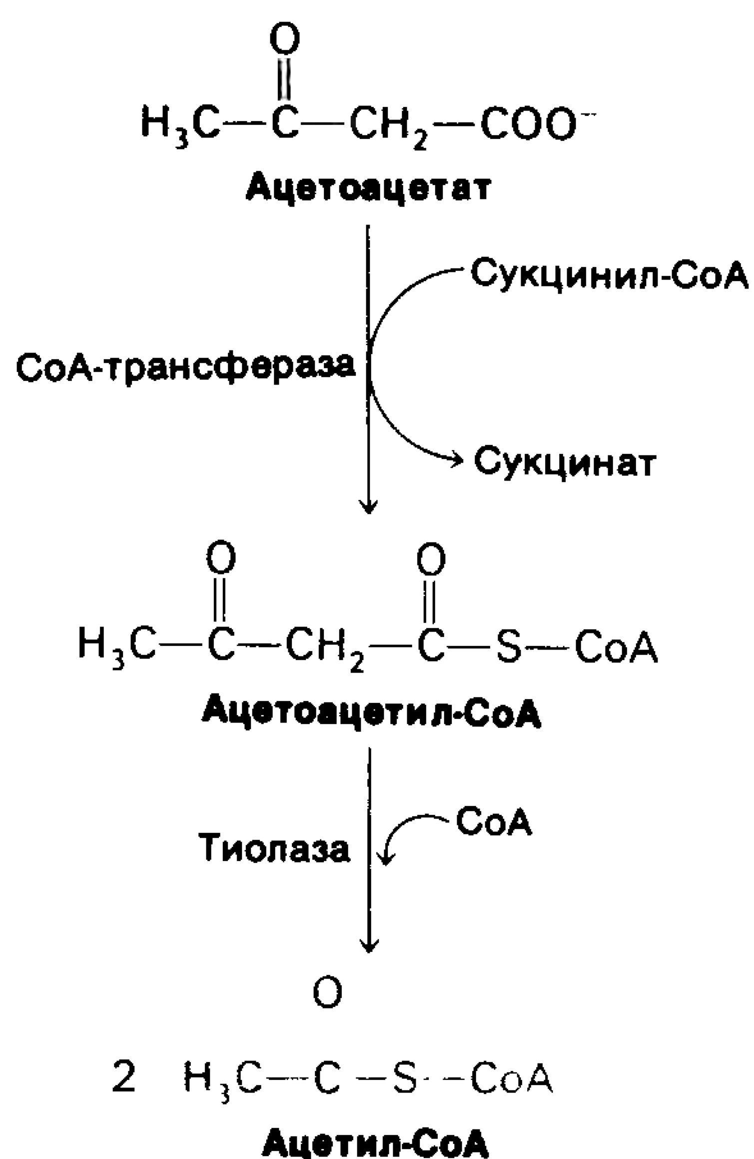


Рис. 23.12. Включение кетоновых тел в цикл трикарбоновых кислот.

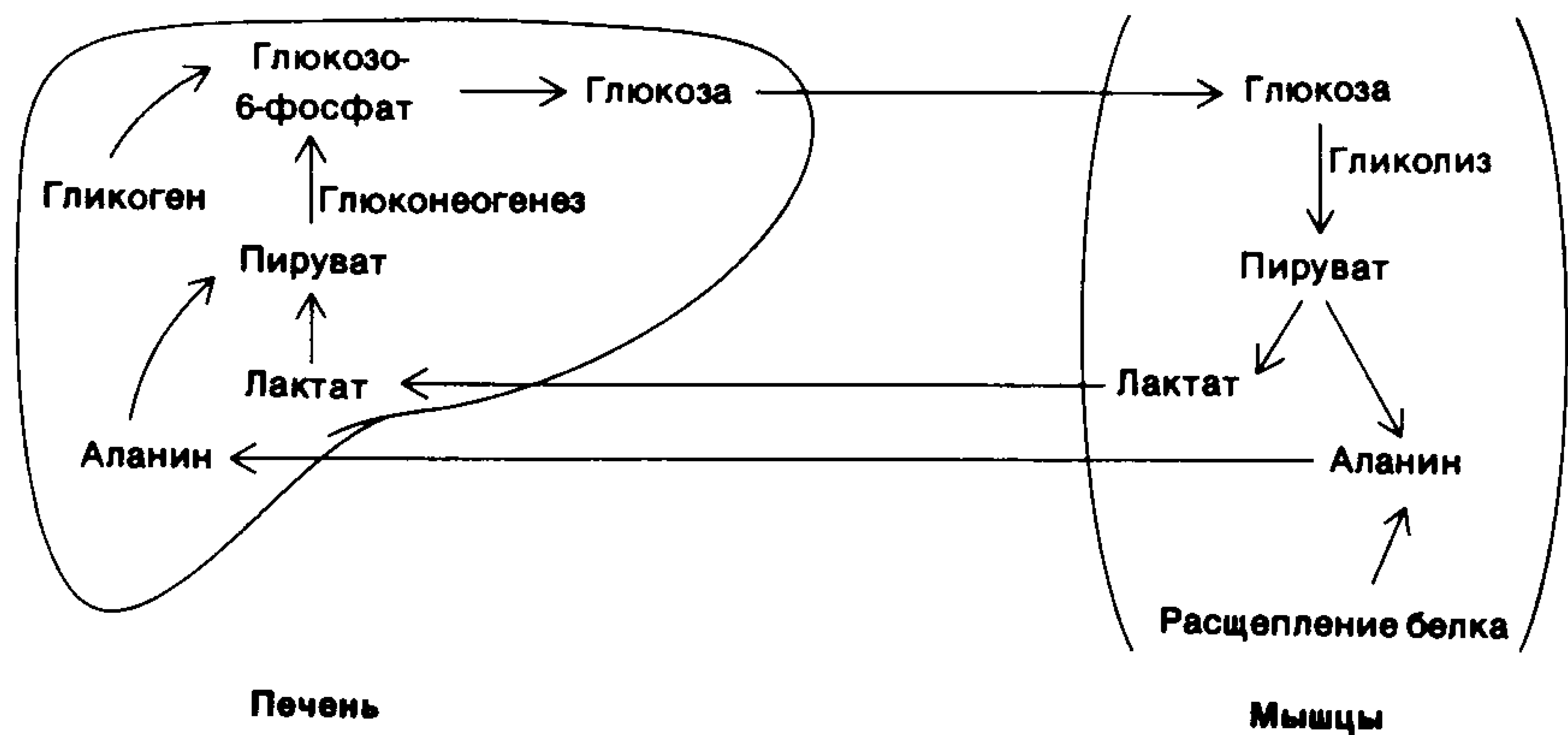


Рис. 23.13. Обмен метаболитами между мышцами и печенью.

Судьба ацетил-СоА в метаболизме в отличие от многих других молекул строго определена. Ацетильный остаток может быть полностью окислен до CO_2 в цикле трикарбоновых кислот. Другая возможность – образование 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА из трех молекул ацетил-СоА. Это шестиуглеродное соединение – предшественник холестерола и кетоновых тел. Третий важный путь использования ацетил-СоА – его экспорт в цитозоль в виде цитрата для синтеза жирных кислот. Важно еще раз подчеркнуть, что в организме млекопитающих ацетил-СоА не может превращаться в пируват. Следовательно, у млекопитающих липиды не могут превращаться в углеводы.

23.5. Метаболические особенности основных органов

Метаболизм в мозгу, мышцах, жировой ткани и печени сильно различается. Рассмотрим различия между этими органами в отношении использования богатых энергией молекул.

1. *Мозг. Глюкоза – практически единственный источник энергии в мозгу человека*, за исключением условий продолжительного голодания. В мозгу нет запасов богатых энергией молекул, поэтому он нуждается в постоянном поступлении глюкозы. Мозг поглощает около 120 г глюкозы в сутки, что соответствует в энергетическом выражении 420 ккал. В состоянии покоя мозг расходует около 60% того количества глюкозы, которое в целом потребляется в организме. *При голодании глюкозу в качестве источника энергии для мозга заменяют кетоновые тела (ацетоацетат и его восстановленный аналог 3-гидроксибутират).* Ацетоацетат активируется путем переноса СоА с молекулы сукцинил-СоА; при этом образуется ацетоацетил-СоА (рис. 23.12). Затем расщепление тиолазой дает две молекулы ацетил-СоА, которые включаются в цикл трикарбоновых кислот. Жирные кислоты не могут служить источником энергии для мозга, так как они связаны с альбумином и неспособны проникнуть через гематоэнцефалический барьер. Итак, *кетоновые тела – транспортабельный эквивалент жирных кислот.* Чуть ниже мы обсудим, почему использование в качестве энергетических ресурсов не глюкозы, а кетоновых тел имеет важное значение для того, чтобы свести к минимуму распад белков во время голодания.

Таблица 23.1. **Энергетические ресурсы у среднего мужчины весом 70 кг. (Cahill G. F., Jr., Clin. Endocrinol. Metab., 5, 398, 1976)**

Орган	Количество доступной энергии, ккал		
	глюкоза или гликоген	триацилглицеролы	мобилизуемые белки
Кровь	60	45	0
Печень	400	450	400
Мозг	8	0	0
Мышцы	1200	450	24 000
Жировая ткань	80	135 000	40

2. *Мышцы. Основные источники энергии в мышцах – глюкоза, жирные кислоты и кетоновые тела.* Мышцы отличаются от мозга большим запасом гликогена (1200 ккал). Около трех четвертых всего гликогена организма находится в мышцах (табл. 23.1). Содержание гликогена в мышцах после еды может достигать 1%. Этот гликоген легко превращается в глюкозо-6-фосфат для последующего использования в мышечных клетках. В мышцах, как и в мозгу, глюкозо-6-фосфатазы нет, в связи с чем экспорта глюкозы из этих клеток не происходит. *Вместо этого мышцы задерживают глюкозу, которую они предпочитают другим источникам энергии в периоды повышенной активности.* В активно сокращающихся скелетных мышцах скорость гликолиза сильно превосходит скорость цикла трикарбоновых кислот. Пируват, образующийся в этих условиях, большей частью восстанавливается до лактата. Лактат переходит в печень, где он превращается в глюкозу. В результате этих превращений, называемых циклом Кори (разд. 15.21), часть метаболических отходов мышц перемещается в печень. Кроме того, в активно работающей мышце образуется большое количество аланина в результате трансаминирования пирувата. Подобно лактату, аланин может превращаться в печени в глюкозу. Совершенно иначе организован метаболизм покоящейся мышцы. *В ней основным источником энергии служат жирные кислоты.* Источником энергии для сердечной мышцы могут служить также кетоновые тела. Более того, сердечная мышца предпочитает ацетоацетат глюкозе.

3. *Жировая ткань.* Запасы триацилглицеролов в жировой ткани содержат огромный резерв метаболической энергии. Он составляет 135000 ккал в организме среднего взрослого мужчины весом 70 кг. Жировая ткань специально приспособлена для этерификации жирных кислот и их высвобождения из триацилглицеролов. У человека основное место синтеза жирных кислот – печень; поэтому важнейшая биохимическая функция жировй ткани состоит в активации этих жирных кислот и в переносе активированных СоА-производных на глицерол. Глицерол-3-фосфат, ключевой промежуточный продукт этого биосинтеза (разд. 20.1), получается при восстановлении дигидроксиацетонфосфата, который образуется из глюкозы в результате гликолиза. Клетки жировой ткани неспособны фосфорилировать эндогенный глицерол, так как не содержат соответствующей киназы. Поэтому *для синтеза триацилглицеролов жировым клеткам необходима глюкоза. Триацилглицеролы* гидролизуются до жирных кислот и глицерола под действием липаз. Реакция, лимитирующая скорость всего процесса,– освобождение первой жирной кислоты из триацилглицерола. Его катализирует гормон-зависимая липаза, которая может обратимо фосфорилироваться. Как и при метаболизме гликогена, сАМР выступает в качестве посредника запускаемого гормоном усиливающего каскада. Триацилглицеролы в жировой ткани постоянно гидролизуются и ресинтезируются. Глицерол, образующийся при гидролизе, переносится в печень. Если глицерол-3-фосфат имеется в избытке, жирные кислоты снова подвергаются этерификации. Если же вследствие недостатка глюкозы создается дефицит глицерол-3-фосфата, они выделя-



Рис. 23.14. Синтез и расщепление триацилглицеролов в жировой ткани. Жирные кислоты поступают в жировую ткань в виде липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП).



Рис. 23.15. Электронная микрофотография части клетки печени, активно участвующей в синтезе и секреции частиц липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП). Стрелкой отмечен пузырек, выбрасывающий свое содержимое – частицы ЛОНП. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

ются в плазму крови. Таким образом, концентрация глюкозы в жировых клетках – основной фактор, от которого зависит выделение жирных кислот в кровь.

4. **Печень.** Метаболическая активность печени обеспечивает источниками энергии мозг, мышцы и другие периферические органы. Вещества, всасываемые в кишечнике, попадают главным образом в печень, что позволяет ей регулировать концентрацию в крови многих метаболитов. Печень поглощает большое количество глюкозы и превращает ее в гликоген. Таким образом, она способна запасать до 400 ккал. Печень может выделять глюкозу в кровь, расщепляя гликоген, в виде которого глюкоза запасается, или осуществляя глюконеогенез. Основные предшественники глюкозы – лактат и аланин, поступающие из мышц, глицерол – из жировой ткани и глюкогенные аминокислоты, поступающие с пищей. Кроме того, печень играет главную роль в регуляции липидного метаболизма. Когда в организме имеется избыток источников энергии, жирные кислоты синтезируются в печени, этерифицируются и секретируются в кровь в виде липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) (рис. 23.15). Эти липопротеины плазмы – основной источник жирных кислот, используемых жировой тканью для синтеза триацилглицеролов. В то же время в условиях голодания печень превращает жирные кислоты в кетоновые тела. Как же клетки печени выбирают один из этих взаимоисключающих путей? Выбор зависит от того, должны ли жирные кислоты проникать в митохондриальный матрикс. Напомним, что жирные кислоты с длинной цепью проходят через внутреннюю митохондриальную мембрану только в том случае, если они связаны эфирной связью с карнитином (разд. 17.7). Фермент, ката-

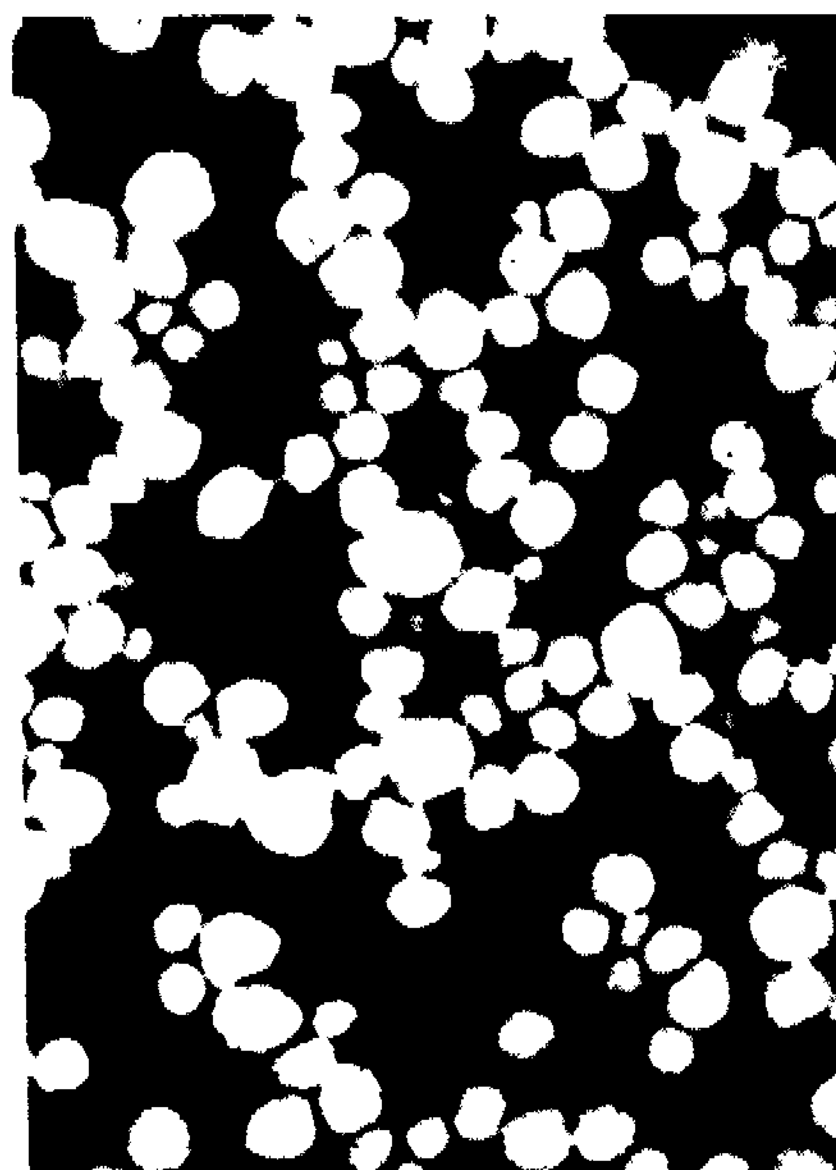
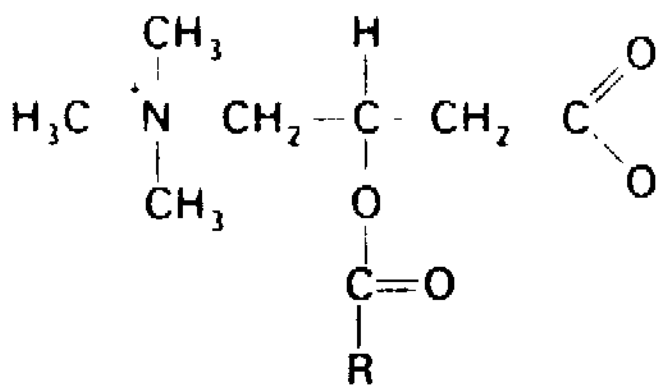


Рис. 23.16. Электронная микрофотография частиц липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП). Эти частицы имеют диаметр от 300 до 800 Å; они переносят триацилглицеролы из печени в жировую ткань. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robert Mahley.)



Эфир жирной кислоты и карнитина

лизирующий образование ацилкарнитина на наружной поверхности этой мембраны, ингибируется малонил-СоА – промежуточным продуктом, определяющим дальнейшую последовательность реакций в синтезе жирных кислот. *Таким образом, при синтезе жирных кислот с длинной цепью они не проникают в митохондриальный матрикс – компартмент, где происходит β-окисление и образование кетоновых тел. Эти жирные кислоты включаются в триацилглицеролы и фосфолипиды.* Если же источников энергии недостаточно, концентрация малонил-СоА, напротив, понижается. В этих условиях жирные кислоты, выделяющиеся из жировой ткани, проникают в митохондриальный матрикс для последующего превращения в кетоновые тела. Как печень обеспечивает свои энергетические потребности? Сама она в качестве источника энергии предпочитает глюкозе кетокислоты, образующиеся при распаде аминокислот. Действительно, основное назначение гликолиза в печени – образование строительных блоков для биосинтезов. К тому же печень не может использовать в качестве источника энергии ацетоацетат, так как она не содержит трансферазу, необходимую для его активации путем образования ацетил-СоА. Таким образом, печень избегает тех источников энергии, которые она отправляет в мышцы и мозг,– прямо-таки альтруистический орган!

23.6. Гормональные регуляторы энергетического метаболизма

Гормонам принадлежит ключевая роль в интеграции метаболизма. В частности, *инсулин, глюкагон, адреналин и норадреналин* оказывают значительное воздействие на запасание и мобилизацию энергетических ресурсов и связанные с этими процессами метаболические превращения.

1. *Инсулин.* Это белковый гормон с мол. массой 5,8 кДа (разд. 2.6 и 35.8). Он секретируется β-клетками поджелудочной железы и служит важнейшим регулятором энергетического метаболизма. *По сути дела, инсулин различными способами сигнализирует о наличии пищевых ресурсов в организме: он стимулирует создание энергетических запасов и синтез белка.* Синтез гликогена в мышцах и печени под действием инсулина стимулируется, а глюконеогенез в печени подавляется. Инсулин ускоряет гликолиз в печени, что в свою очередь усиливает синтез жирных кислот. Инсулин способствует поступлению глюкозы в мышцы и жировые клетки. Изобилие жирных кислот и глюкозы в жировой ткани приводит к синтезу и запасанию триацилглицеролов. Действие инсулина распространяется также на метаболизм аминокислот и белков. Инсулин способствует поглощению в мышцах аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина и изолейцина), что благоприятствует образованию мышечного белка. В целом инсулин оказывает стимулирующее действие на синтез белка. Кроме того, он подавляет внутриклеточный распад белков.

2. *Глюкагон.* Это полипептидный гормон с мол. массой 3,5 кДа (разд. 16.10). Он секретируется α-клетками поджелудочной железы в ответ на *понижение концентрации сахара в крови. Основной орган-мишень глюкагона – печень.* Глюкагон стимулирует расщепление гликогена и ингибирует его синтез, запуская каскад реакций, опосредуемых сАМР. В результате происходит фосфорилирование фосфорилазы и гликоген-синтетазы (разд. 16.15). Кроме того, глюкагон ингибирует синтез жирных кислот, снижая образование пирувата и активность аце-

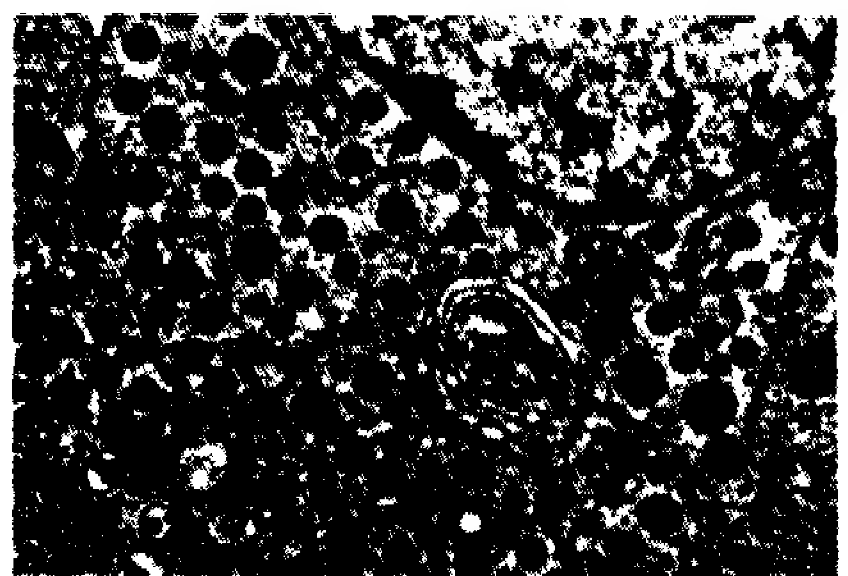


Рис. 23.17. Электронная микрофотография гранул, содержащих глюкагон, в α-клетках поджелудочной железы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Arthur Like.)

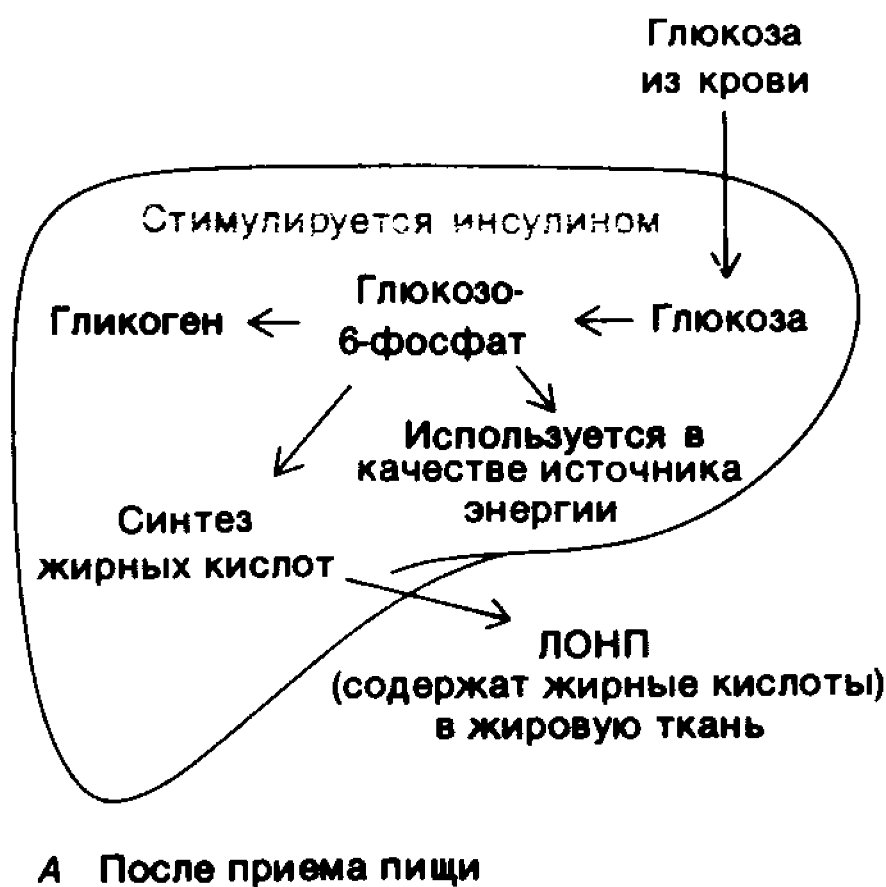




Рис. 23.18. Регуляция содержания глюкозы в крови печенью. *А* – после приема пищи, *Б* – утром натощак.

тил-СоА—карбоксилазы. К тому же глюкагон стимулирует глюконеогенез. В итоге все эти изменения приводят к *заметному снижению выделения глюкозы печенью.* Помимо этого, глюкагон повышает содержание циклического АМР в жировых клетках, а это в свою очередь способствует расщеплению триацилглицеролов.

3. *Адреналин и норадреналин.* Эти гормоны относятся к катехоламинам. Они секретируются мозговым слоем надпочечников и окончаниями симпатических нервов в ответ на *снижение концентрации глюкозы в крови.* Подобно глюкагону, они стимулируют мобилизацию гликогена и триацилглицеролов, запуская каскад реакций, опосредуемых сАМР. Их отличие от глюкагона состоит в том, что проявляемый ими гликогенолитический эффект более выражен в мышцах, чем в печени. Еще одна функция катехоламинов – ингибировать поглощение глюкозы мышцами. Вместо глюкозы в качестве источника энергии используются жирные кислоты, высвобождающиеся из жировой ткани. Кроме того, адреналин стимулирует выделение глюкагона и подавляет выделение инсулина. *Таким образом, катехоламины увеличивают количество глюкозы, выделяемое печенью в кровь, и снижают потребление глюкозы мышцами.*

23.7. Печень выполняет роль буфера в регуляции содержания глюкозы в крови

Концентрация глюкозы в норме натощак составляет 80 мг/100 мл (4,4 мМ). В течение дня концентрация глюкозы в крови в норме колеблется от 80 мг/100 мл перед едой до примерно 120 мг/100 мл после еды. Как же поддерживается относительно постоянный уровень содержания глюкозы, несмотря на значительные изменения в ее поступлении и использовании? Выше мы уже обсуждали основные регуляторные элементы, так что теперь мы рассмотрим их во взаимодействии. Содержание глюкозы в крови регулируется прежде всего печенью, которая может поглощать и выделять в кровь большое количество глюкозы в ответ на гормональные сигналы и на само изменение концентрации глюкозы (рис. 23.18). Повышение концентрации глюкозы в крови, происходящее после приема богатой углеводами пищи, в свою очередь вызывает повышение содержания глюкозо-6-фосфата в печени, так как только в этих условиях каталитические участки глюкокиназы заполняются глюкозой. Напомним, что глюкокиназа в отличие от гексокиназы имеет высокую K_M для глюкозы (~ 10 мМ, тогда как концентрация глюкозы в крови натощак составляет 4,4 мМ) и не ингибируется глюкозо-6-фосфатом. *В результате при повышении содержания глюкозы в крови скорость образования глюкозо-6-фосфата в печени увеличивается.* Дальнейшая судьба глюкозо-6-фосфата регулируется в основном противоположно направленным действием глюкагона и инсулина. Глюкагон запускает каскадный механизм регуляции,

опосредуемый cAMP (разд. 16.15), что приводит к расщеплению гликогена, тогда как инсулин, будучи антагонистом глюкагона, оказывает противоположное действие. *Высокая концентрация глюкозы приводит к пониженной секреции глюкагона и повышенной секреции инсулина поджелудочной железой. Вследствие этого при повышенном содержании глюкозы в крови быстро синтезируется гликоген.* Эти гормональные воздействия на синтез и сохранение запасов гликогена усиливаются непосредственным действием самой глюкозы. Как обсуждалось ранее (разд. 16.18), *фосфорилаза а, способная расщеплять гликоген, чувствительна к концентрации глюкозы.* Когда концентрация глюкозы высока, связывание глюкозы с форфорилазой *а* делает ее чувствительной к действию фосфатазы, превращающей ее в фосфорилазу *b*. Фосфорилаза *b* неспособна расщеплять гликоген. Это превращение приводит также к высвобождению фосфатазы, что позволяет ей активировать гликоген-синтазу. *Таким образом, глюкоза аллостерически переключает метаболизм гликогена с расщепления на синтез.*

Высокое содержание инсулина после еды способствует также *проникновению глюкозы в мышцы и жировую ткань.* Инсулин стимулирует синтез гликогена как в мышцах, так и в печени. Благодаря большой массе мышцы могут запасать примерно втрое больше гликогена, чем печень. Поступление глюкозы в жировую ткань обеспечивает образование глицерол-3-фосфата для синтеза триацилглицеролов.

Содержание глюкозы в крови начинает снижаться через несколько часов после еды, что вызывает снижение секреции инсулина и повышение секреции глюкагона. Описанные выше процессы протекают в обратном направлении. Активация каскада реакций, опосредуемых cAMP, приводит к повышению концентрации фосфорилазы *а* и понижению концентрации гликоген-синтазы *а*. Действие гормонов на этот каскадный механизм усилйвается пониженным связыванием глюкозы с фосфорилазой *а*, что делает ее менее чувствительной к гидролитическому действию фосфатазы. Вместо этого фосфатаза остается связанной с фосфорилазой *а*, так что гликоген-синтаза остается в неактивной фосфорилированной форме. Так осуществляется быстрая мобилизация гликогена. Большое количество глюкозы, которое образуется при гидролизе глюкозо-6-фосфата после расщепления гликогена, выделяется из печени в кровь. Пониженное потребление глюкозы мышцами и жировой тканью также вносит свой вклад в поддержание концентрации глюкозы в крови на определенном уровне. Поглощение глюкозы мышцами и жировой тканью снижается из-за низкой концентрации инсулина. При уменьшении концентрации глюкозы в крови и мышцы, и печень используют в качестве источника энергии жирные кислоты. *Итак, концентрация глюкозы в крови удерживается на уровне выше примерно 80 мг/100 мл под действием трех основных факторов: мобилизации гликогена и высвобождения глюкозы печенью; выделения жирных кислот жировой тканью; переключения мышц и печени на использование в качестве источника энергии жирных кислот вместо глюкозы.*

23.8. Адаптация метаболизма к продолжительному голоданию: снижение распада белков

Рассмотрим теперь, каким образом обмен веществ приспосабливается к продолжительному голоданию.

В организме взрослого неголодающего мужчины весом 70 кг энергетические ресурсы составляют в норме 1600 ккал в виде гликогена, 24 000 ккал в виде мобилизуемого белка и 135 000 ккал в виде триацилглицеролов (табл. 23.1). Суточная потребность в энергии составляет от 1600 ккал в состоянии покоя до 6000 ккал в зависимости от степени активности. Таким образом, энергетический запас достаточен для обеспечения потребностей организма при голодании в течение 1–3 мес. Однако запас углеводов истощается всего лишь за сутки. Несмотря на это, концентрация глюкозы в крови поддерживается на уровне не ниже 50 мг/100 мл. Мозг не выдерживает даже кратковременного снижения концентрации глюкозы ниже этого уровня. Поэтому *главная задача метаболизма при голодании – обеспечить достаточно высокую концентрацию глюкозы для мозга и других тканей (например, эритроцитов), которые полностью зависят от этого источника энергии.* Однако в организме не слишком много предшественников глюкозы. Бо́льшая часть энергии запасается в форме остатков жирных кислот триацилглицеролов. Напомним,

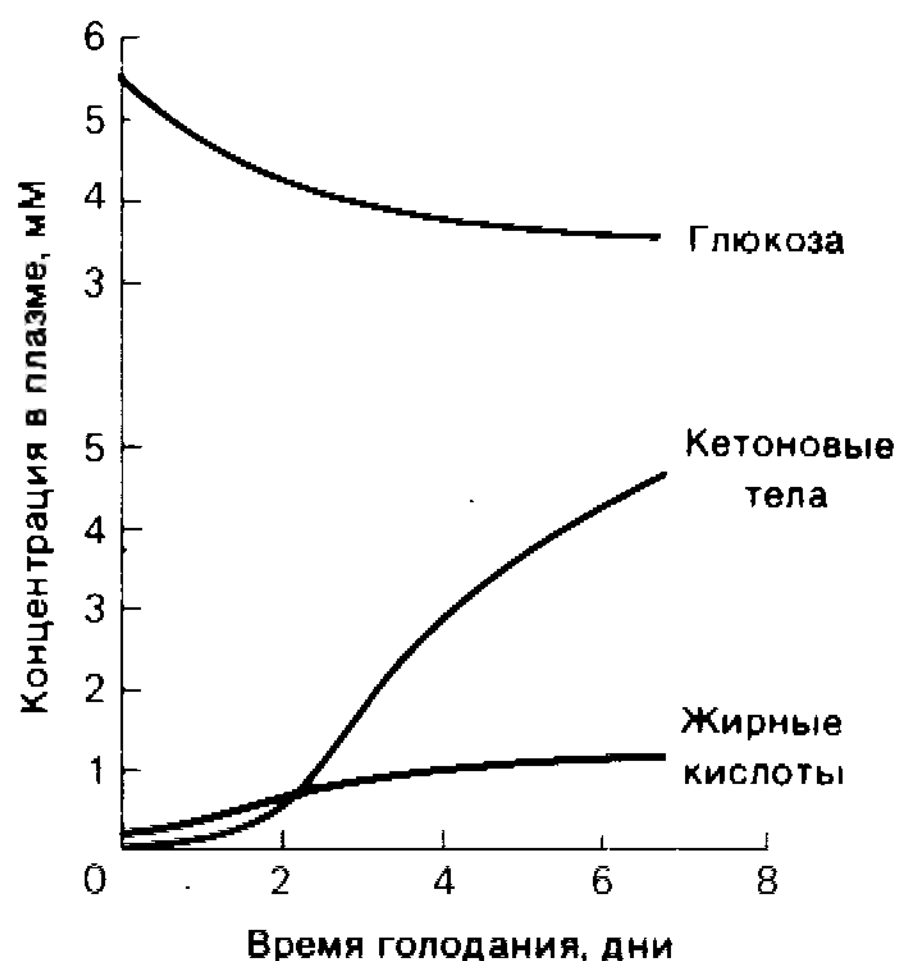


Рис. 23.19. Содержание жирных кислот и кетоновых тел в сыворотке крови при голодании увеличивается, а содержание глюкозы уменьшается.

что жирные кислоты не могут превращаться в глюкозу, так как ацетил-СоА не превращается в пируват (разд. 17.14). Глицероловый компонент триацилглицеролов (триглицеридов) может превращаться в глюкозу, но он имеется лишь в ограниченном количестве. Остается только один потенциальный источник глюкозы – аминокислоты, образующиеся при распаде белков. Мышцы – самый богатый источник аминокислот при голодании. Однако выживание для большинства голодающих людей зависит от способности двигаться, а для этого требуется большая мышечная масса. *Таким образом, вторая задача метаболизма при голодании – сохранить белки. Это достигается переключением метаболизма на такой путь, при котором в качестве источника энергии используется не глюкоза, а жирные кислоты и кетоновые тела* (рис. 23.19).

Метаболические изменения в течение первых суток голодания подобны состоянию организма натощак после ночного сна. Низкий уровень содержания сахара в крови приводит к снижению секреции инсулина и повышению секреции глюкагона. *Доминирующие метаболические процессы – мобилизация триацилглицеролов в жировой ткани и глюконеогенез в печени. Печень получает энергию для своих нужд путем окисления жирных кислот, высвобождающихся из жировой ткани.* Затем повышаются концентрации ацетил-СоА и цитрата, а это выключает гликолиз. Поглощение глюкозы мышцами существенно снижается из-за низкой концентрации инсулина, тогда как жирные кислоты свободно проникают в мышцы. Вследствие этого *мышцы также переключаются с использования глюкозы в качестве источника энергии на использование жирных кислот.* β-Окисление жирных кислот в мышцах останавливает превращение пирувата в ацетил-СоА. В результате пируват, лактат и аланин переносятся в печень, где они превращаются в глюкозу. Протеолиз мышечных белков дает часть этих трехуглеродных предшественников глюкозы. Другое сырье для синтеза глюкозы в печени – глицерол, образующийся при расщеплении триацилглицеролов.

Важнейшее изменение, наступающее через трое суток голодания,– образование в печени больших количеств ацетоацетата и β-гидроксибутирата (кетоновых тел) (рис. 23.20). Поскольку цикл трикарбоновых кислот не способен окислить все ацетильные группы, образующиеся при расщеплении жирных кислот, синтез кетоновых тел из ацетил-СоА существенно увеличивается. Глюконеогенез истощает запас оксалоацетата, необходимого для вступления ацетил-СоА в цикл трикарбоновых кислот. Это приводит к тому, что в печени образуются большие количества кетоновых тел, которые выделяются в кровь. К этому времени мозг начинает потреблять значительное количество ацетоацетата вместо глюкозы. Через три дня голодания примерно треть энергетических потребностей мозга удовлетворяется кетоновыми телами (табл. 23.2). Сердечная мышца также использует в качестве источника энергии кетоновые тела. Все эти изменения энергетического метаболизма называют *кетозом.*

Через несколько недель голодания кетоновые тела становятся основным источником энергии для мозга (табл. 23.2). Мозгу необходимо всего 40 г глюкозы в сутки, тогда как в первый день голодания он потребляет 120 г. *Интенсивное превращение жирных кислот в кетоновые тела в печени и их использование мозгом существенно снижают потребность в глюкозе. Поэтому распад мышечных белков снижается по сравнению*

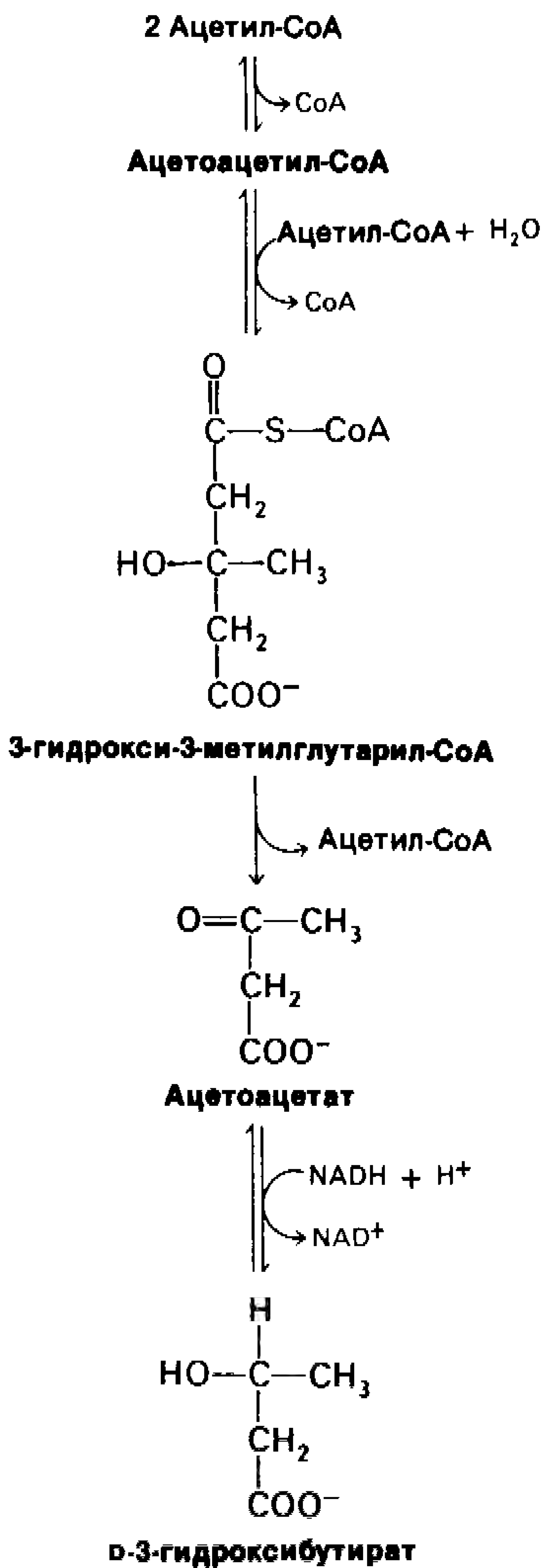


Рис. 23.20. Синтез кетоновых тел в печени.

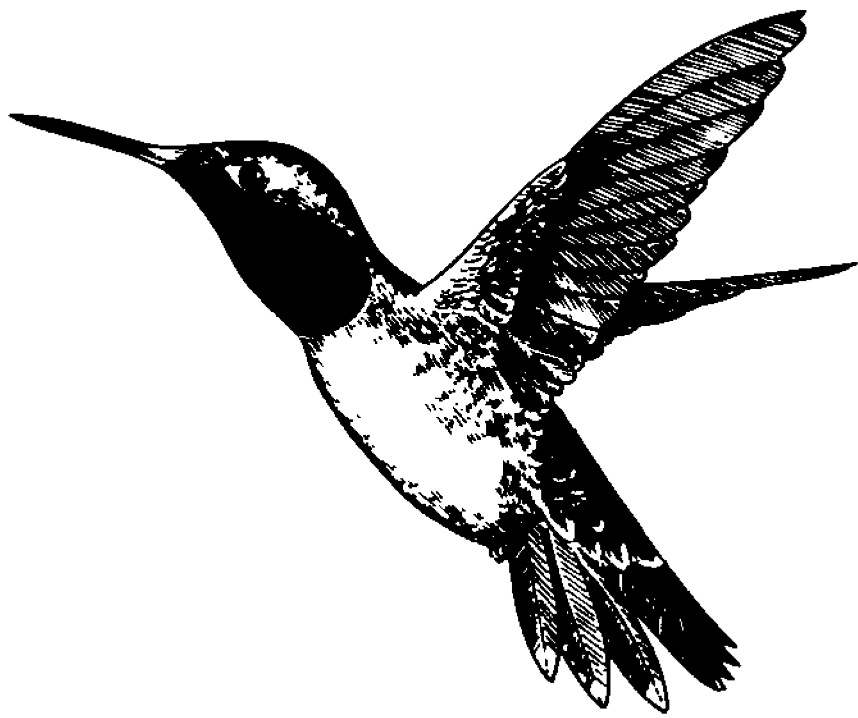
с первыми днями голодания. Самое главное для выживания – расщепление 20 г мышечного белка вместо 75 г в начале голодания. Максимальная продолжительность голодания зависит от запаса триацилглицеролов.

23.9. Огромные запасы жира позволяют перелетным птицам покрывать большие расстояния

Еще одна удивительная иллюстрация биологической ценности триацилглицеролов – перелетные птицы. Некоторые небольшие наземные птицы улетают осенью со своих летних угодий в Новой Англии на зимовку в Вест-Индию и возвращаются весной. Они пролетают над водой без остановок 2400 км. Эти птицы поддерживают скорость 40 км/ч на протяжении 60 ч. Такой удивительный подвиг возможен благодаря большим запасам жира, которые эффективно используются во время долгого полета. Птицы, мигрирующие на короткие расстояния или вообще не мигрирующие, относительно тощи. Их жировой индекс составляет примерно 0,3; жировой индекс – отношение общего сухого веса жира тела к сухому весу тела птицы за вычетом жира. Птицы, мигрирующие на большие расстояния, наоборот, готовясь к перелету над сушей, накапливают довольно много жира, а непосредственно перед вылетом в путь над морем становятся весьма тучными. Жировой индекс достигает у них 3. У краснозобого колибри за сутки накапливается около 0,15 г триацилглицеролов на 1 г веса тела. У человека это соответствовало бы увеличению веса на 10 кг в сутки. Накопленный жир у перелетных птиц сохраняется под кожей, в брюшной полости, в мышцах и в печени. За время долгого перелета над водой расходуется около двух третей этого

Таблица 23.2. **Энергетический метаболизм при голодании**

Энергетический обмен и потребление энергии	Образование и использование энергетических ресурсов в течение суток, г	
	3-й день	40-й день
Использование энергетических ресурсов в мозгу		
Глюкоза	100	40
Кетоновые тела	50	100
Расход глюкозы в других органах	50	40
Мобилизация энергетических ресурсов		
Липолиз в жировой ткани	180	180
Расщепление мышечных белков	75	20
Образование источников энергии в печени		
Глюкоза	150	80
Кетоновые тела	150	150



Краснозобый колибри

жирового запаса. Переход на использование в качестве источника энергии жирных кислот и кетоновых тел должен происходить очень быстро, так как за время 60-часового полета почти не происходит расщепления белка. Кроме того, окисление жира обеспечивает этих птиц водой, необходимой для восполнения потерь в дыхательных путях. Следует отметить высокую эффективность триацилглицеролов в качестве запасного источника энергии. Напомним, что в триацилглицеролах запасается в 6 раз больше энергии, чем в гликогене, так как они не содержат воды и находятся в более восстановленном состоянии (разд. 17.3). Перелетные птицы, у которых такое же количество энергетических ресурсов было бы запасено в виде гликогена, никогда не достигли бы суши!

Заключение

Стратегия метаболизма состоит в том, чтобы генерировать ATP, восстановительную способность и строительные блоки для биосинтетических процессов. Эта сложная система реакций регулируется аллостерическими взаимодействиями, обратимыми ковалентными модификациями, изменениями в количестве ферментов, компартментацией и взаимодействиями между метаболически специализированными органами. Фермент, катализирующий решающий этап метаболического пути, является обычно важнейшим регуляторным пунктом. В качестве примеров можно привести фосфофруктокиназу в гликолизе и ацетил-СоА—карбоксилазу в синтезе жирных кислот. Пути, идущие в противоположных направлениях, например клюконеогенез и гликолиз, скоординированы таким образом, что когда один из этих путей проявляет высокую активность, другой бездействует. Другая пара противоположных последовательностей реакции – синтез и расщепление гликогена – координированно регулируются усиливающим сигнал каскадом, который запускается гормоном и вызывает фосфорилирование гликоген-синтазы и фосфорилазы. Роль компартментации в регуляции можно проиллюстрировать различием в судьбе жирных кислот в цитозоле и в митохондриальном матриксе.

Метаболизм в мозгу, мышцах, жировой ткани и печени сильно различается. У нормально питающегося человека глюкоза служит практически единственным источником энергии для мозга. При голодании кетоновые тела (ацетоацетат и 3-гидроксибутират) приобретают роль главного источника энергии для мозга. Мышцы используют в качестве источника энергии глюкозу, жирные кислоты и кетоновые тела и синтезируют гликоген в качестве энергетического резерва для собственных нужд. Жировая ткань специализируется на синтезе, запасании и мобилизации триацилглицеролов. Многообразные метаболические процессы печени поддерживают работу других органов. Печень может быстро мобилизовать гликоген и осуществлять глюконеогенез для обеспечения потребностей других органов. Печень играет главную роль в регуляции липидного метаболизма. Когда источники энергии имеются в достатке, происходят синтез и этерификация жирных кислот. Затем они переходят из печени в жировую ткань в виде липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП). Однако при голодании жирные кислоты превращаются в печени в кетоновые тела. Интеграция активности всех этих органов осуществляется гормонами. Инсулин сигнализирует об изобилии пищевых ресурсов: он стимулирует образование гликогена и триацилглицеролов, а также синтез белка. Глюкагон наоборот, сигнализирует о пониженном содержании глюкозы в крови; он стимулирует расщепление гликогена и глюконеогенез в печени и гидролиз триацилглицеролов в жировой ткани. Адреналин и норадреналин действуют на энергетические ресурсы подобно глюкагону; отличие состоит в том, что их основная мишень – мышцы, а не печень.

Концентрация глюкозы в крови хорошо

питающегося человека обычно составляет 80–120 мг/100 мл. После еды повышение концентрации глюкозы в крови приводит к повышенной секреции инсулина и пониженной секреции глюкагона. Вследствие этого в мышцах и печени начинается синтез гликогена. Увеличенное поступление глюкозы в жировую ткань обеспечивает ее глицерол-3-фосфатом для синтеза триацилглицеролов. Через несколько часов, когда содержание глюкозы падает, все эти процессы прекращаются. После этого глюкоза образуется путем расщепления гликогена и глюконеогенеза, а в результате гидролиза триацилглицеролов происходит высвобождение жирных кислот. Печень и мышцы начинают использовать для удовлетворения своих энергетических потребностей жирные кислоты вместо глюкозы, а глюкоза сохраняется для использования в мозгу и других тканях, находящихся в большой зависимости от нее. Адаптация метаболизма к голоданию направлена на то, чтобы свести к минимуму расщепление белка. Печень образует из жирных кислот большое количество кетоновых тел, которые появляются в крови через несколько дней после начала голодания. По прошествии нескольких недель голодания кетоновые тела приобретают роль основных источников энергии для мозга. Снижение потребности в глюкозе приводит к уменьшению скорости распада мышечных белков, и вероятность выживания увеличивается.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Newsholme E. A., Start C., 1973. Regulation in Metabolism, Wiley. (Превосходный обзор регуляции метаболизма углеводов и липидов.)

Stalmans W., 1976. The role of the liver in the homeostasis of blood glucose, Curr. Top. Cell Regul., **11**, 51–97.

Cahill G. F., Jr., 1976. Starvation in man, Clin. Endocrinol. Metab., **5**, 397–415.

Newsholme E. A., 1980. A possible metabolic basis for the control of body weight, New Eng. J. Med., **302**, 400–405. (Предлагается гипотеза, согласно которой ожирение обусловлено снижением циклических превращений субстратов в парах противоположно направленных реакций, например в реакциях, катализируемых фосфофруктокиназой и фруктозо-1,6-бисфосфатазой.)

Книги

Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds.), 1980. Metabolic Control and Disease, Saunders.

Lundquist F., Tygstrup N. (eds.), 1974. Regulation of Hepatic Metabolism, Munksgaard. (Содержит статьи о роли печени в интеграции метаболизма.)

Howald H., Poortmans J. R. (eds.), 1975. Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise, Birkhauser Verlag, Basel.

Atkinson D. E., 1977. Cellular Energy Metabolism and Its Regulation, Academic Press.

Углеводный метаболизм

Felig P., 1980. Disorders of carbohydrate metabolism. In: Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds.), Metabolic Control and Disease, Saunders. (Прекрасный обзор, посвященный регуляции углеводного метаболизма и его связи с метаболизмом белков и липидов.)

Esmann V. (ed.), 1978. Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism, Pergamon Press.

Cahill G. F., Jr., Owen O. E., 1968. Some observations on carbohydrate metabolism in man. In: Dickens F., Randle P. J. and Whelan W. J. (eds.), Carbohydrate Metabolism and Its Disorders, vol. 1, pp. 497–522, Academic Press.

Глюконеогенез

Snell K., 1979. Alanine as a gluconeogenic carrier, Trends Biochem. Sci., **4**, 124–128.

Hanson R., Mehlman M. (eds.), 1976. Gluconeogenesis, Wiley.

Метаболизм аминокислот

Felig P., 1975. Amino acid metabolism in man, Ann. Rev. Biochem., **44**, 933–955.

Dice J. F., Walker C. D., Byrne B., Cardiel A., 1978. General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 2093–2097.

Метаболизм липидов

McGarry J. D., Foster D. W., 1980. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production, Ann. Rev. Biochem., **49**, 395–420.

McGarry J. D., Takabayashi Y., Foster D. W., 1978. The role of malonyl CoA in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes, J. Biol. Chem., **253**, 8294–8300.

Williamson D. H., 1979. Recent developments in ketone-body metabolism, Biochem. Soc. Trans., **7**, 1313–1321.

Odum E. P., 1965. Adipose tissue in migratory birds. In: Renold A. E. and Cahill G. F. (eds.), Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue, pp. 37–43, American Physiological Society.

Taylor S. I., Jungas R. L., 1974. Regulation of lipogenesis in adipose tissue, Arch. Biochem. Biophys., **164**, 12–19.

McGarry J. D., Foster D. W., 1977. Hormonal control of ketogenesis, Arch. Intern. Med. **137**, 495–501.

Grey N. J., Karl I., Kipnis D. M., 1975. Physiologic mechanisms in the development of starvation ketosis in man, Diabetes, **24**, 10–16.

Спектроскопия клеток и тканей

Shulman R. G., Brown T. R., Ugurbil K., Ogawa S., Cohen S. M., den Hollander J. A., 1979. Cellular applications of ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance, Science, **205**, 160–166. (Рассматривается новый весьма информативный метод исследования метаболических процессов в интактных клетках и тканях.)

McLaughlin A. C., Takeda H., Chance B., 1979. Rapid ATP assays in perfused mouse liver by ^{31}P NMR, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 5445–5449. (Многообещающий подход к изучению метаболизма в интактных органах.)

ОТВЕТЫ НА ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

Глава 11

1. Реакции «а» и «в» направлены влево, реакции «б» и «г» – вправо.
2. Никак (использовать их для этой цели нельзя никак).
3. а) $\Delta G^{0\prime} = +7{,}5$ ккал/моль и $K'_{eq} = 3{,}16 \cdot 10^{-6}$. б) $3{,}16 \cdot 10^{4}$.
4. $\Delta G^{0\prime} = 1{,}7$ ккал/моль. Равновесное отношение составляет 17,8.
5. а) + 0,2 ккал/моль. б) – 7,8 ккал/моль. Гидролиз PP_i направляет реакцию в сторону образования ацетил-CoA.
6. а) $\Delta G^{0} = 2{,}303\ RT\,\mathrm{p}K$. б) – 6,53 ккал/моль при 25°С.
7. ADP-компонент (или близкое к нему производное в случае CoA).
8. Активированной формой сульфата у большинства организмов служит 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат.
   См.: Robbins P. W., Lipmann F., J. Biol. Chem. **229**, 837 (1957).

Глава 12

1. а) Альдоза—кетоза; б) эпимеры; в) альдоза—кетоза; г) аномеры; д) альдоза—кетоза; е) эпимеры.
2. Углерод метильной группы пирувата помечен ^{14}C.
3. а) $\Delta G^{0\prime}$ составляет – 29,5 ккал/моль для реакции
   Глюкоза + $2P_i$ + 2ADP → 2 Лактат + 2 ATP.
   б) $\Delta G^{0\prime} = -27{,}2$ ккал/моль.
4. $3{,}06 \cdot 10^{-5}$.
5. Равновесные концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата, дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата составляют соответственно $7{,}76 \cdot 10^{-4}$, $2{,}24 \cdot 10^{-4}$ и $2{,}24 \cdot 10^{-4}$ М.
6. Все три углеродных атома 2,3-БФГ помечены C^{14}. Атом фосфора, присоединенный к гидроксилу при С-2, помечен ^{32}P.
7. Гексокиназа в отсутствие сахара обладает низкой АТРазной активностью, потому что она находится в каталитически неактивной конформации (разд. 12.12). Добавление ксилозы закрывает щель между двумя долями фермента. Однако в ксилозе отсутствует гидроксиметильная группа при С-6, и поэтому она не может фосфорилироваться. Взамен этого в месте, нормально занимаемом гидроксиметильной группой при С-6, роль акцептора фосфорильной группы, отделяющейся от ATP, выполняет молекула воды.
8. Рентгенокристаллографические исследования Winn S. I., Watson H. C., Harkins R. N., Forthergill L. A., Biochem. Soc. Frans., **5**, 657–659 (1978) свидетельствуют о том, что 3-фосфоглицерат связывается активным центром фермента, в котором гистидин-184 находится в фосфорилированной форме, а гистидин-8 – в свободной. Фосфогистидин-184 переносит свою фосфорильную группу на субстрат, что приводит к образованию 2,3-бисфосфоглицерата. Фосфорильная группа в 3-м положении этого промежуточного продукта переносится далее к гистидину-8 с образованием 2-фосфоглицерата. Регенерирование исходной формы фермента осуществляется путем последующего переноса фосфорильной группы от гистидина-8 к гистидину-184. Отметим сходство этого каталитического механизма с таковым для бисфосфоглицератмутазы (разд. 12.17).

Глава 13

1. а) После одного оборота цикла трикарбоновых кислот метка появляется в С-2 и С-3 оксалоацетата.
   б) После одного оборота цикла трикарбоновых кислот метка появляется в С-1 и С-4 оксалоацетата.
   в) Метка появляется в CO_2 при образовании ацетил-CoA из пирувата.
   г, д) Судьба метки такая же, как в случае «а».
2. Нет, потому что два атома углерода теряются в цикле на двух стадиях декарбоксилирования. Следовательно, накопления оксалоацетата в указанных условиях происходить не может.
3. 0,90, 0,03 и 0,07.
4. – 9,8 ккал/моль.
5. Стереоспецифичность глицеральдегид-3-фос-

фат—дегидрогеназы в отношении кофермента противоположна таковой алкоголь-дегидрогеназы (тип В и тип А соответственно).

6. Тиаминтиазолонпирофосфат - аналог промежуточного переходного состояния. Серусодержащее кольцо этого аналога не несет заряда, и следовательно он очень сходен с промежуточным состоянием нормального кофермента в реакциях, катализируемых тиамином (т. е. с несущей заряда резонансной формой гидроксиэтил-ТПФ, разд. 13.10). Обсуждение, посвященное этому аналогу, см.: Gutowski J. A., Lienhard G. E., J. Biol. Chem., **251**, 2863 (1976).

7. Для образования оксалоацетата отношение малата к оксалоацетату должно превышать $1{,}75 \times 10^4$.

Глава 14

1. а) 15; б) 2; в) 38; г) 16; д) 36 и е) 19.

2. а) $\Delta E_0'$ для этой реакции равно + 1,05 В, $\Delta G^{0\prime}$ составляет − 48,4 ккал/моль.

$2\,\text{Г-SH} + 1/2\,O_2 \rightleftharpoons \text{Г-SS-Г} + H_2O$.

б) $\Delta E_0' = +0{,}09$ В, $\Delta G^{0\prime}$ составляет − 4,15 ккал/моль.

3. а) Блокирует транспорт электронов и протонный насос в 3-м пункте.

б) Блокирует перенос электронов и синтез ATP путем ингибирования обмена ATP и ADP через внутреннюю минохондриальную мембрану.

в) Блокирует перенос электронов и протонный насос в 1-м пункте.

г) Блокирует синтез ATP путем нарушения протонного градиента, не подавляя при этом переноса электронов.

д) Блокирует перенос электронов и протонный насос в 3-м пункте.

е) Блокирует перенос электронов и протонный насос во 2-м пункте.

4. Олигомицин подавляет образование ATP, нарушая использование протонного градиента. Он не блокирует переноса электронов.

5. $\Delta G^{0\prime}$ составляет + 16,1 ккал/моль для окисления с участием NAD^+ и + 1,4 ккал/моль для окисления с участием FAD. Восстановление сукцината с участием NAD^+ термодинамически невозможно.

6. Цианид может оказывать летальный эффект в результате связывания с ферриформой цитохрома $(a + a_3)$ и подавления вследствие этого окислительного фосфорилирования. Нитрит превращает феррогемоглобин в ферригемоглобин, который также связывает цианид. Таким образом ферригемоглобин конкурирует за цианид с цитохромом $(a + a_3)$. Эта конкуренция оказывает лечебное действие, потому что количество ферригемоглобина, которое может быть образовано без нарушения транспорта кислорода, значительно превышает количество цитохрома $(a + a_3)$.

7. Доступная свободная энергия в результате транслокации 2, 3 и 4 протонов составляет соответственно − 9,23, − 13,8 и − 18,5 ккал. Свободная энергия, потребляемая в синтезе 1 моль ATP при стандартных условиях, равна 7,3 ккал. Следовательно, остающаяся свободная энергия величиной в − 1,93, − 6,5 и − 11,2 ккал может запускать синтез ATP до тех пор, пока отношение $[ATP]/[ADP][P_i]$ не составит соответственно 26,2, $6{,}51 \cdot 10^4$ и $1{,}62 \cdot 10^8$. Суспензии изолированных митохондрий синтезируют ATP, пока указанное соотношение не превысит 10^4. Из этого следует, что на один моль синтезируемого ATP транслоцируются минимум три протона.

Глава 15

1. а) 5 Глюкозо-6-фосфат + ATP → 6 Рибозо-5-фосфат + ADP + H^+.

б) Глюкозо-6-фосфат + 12 $NaDP^+$ + 7 H_2O → 6 CO_2 + 12 NADPH + 12 H^+ + P_i.

2. Метка появляется при С-5 рибулозо-5-фосфата.

3. Окислительное декарбоксилирование изоцитрата в α-оксоглутарат. При обеих реакциях в качестве промежуточного продукта образуется β-оксокислота.

4. Во фруктозо-6-фосфате метка обнаруживается при С-1 и С-3, тогда как в эритрозо-4-фосфате метка отсутствует.

5. Блокируются реакции *б* и *д*.

6. Получить шиффово основание между кетозным субстратом и трансальдолазой, восстановить его тритированным $NaBH_4$ и исследовать меченый фермент методом отпечатков пальцев.

Глава 16

1. Галактоза + ATP + UTP + H_2O + Гликоген$_n$ → Гликоген$_{n+1}$ + ADP + UDP + 2P_i + H^+.

2. Фруктоза + 2 ATP + 2 H_2O → Глюкоза + 2 ADP + 2 P_i.

3. Имеет место недостаточность ветвящего фермента.

4. При болезни Гирке повышена концентрация глюкозо-6-фосфата. Следовательно, при этом активна фосфорилированная D-форма гликоген-синтазы.

5. Глюкоза является аллостерическим ингибитором фосфорилазы *а*. Следовательно, кристаллы, растущие в ее присутствии, находятся в Т-состоянии. Добавление глюкозо-1-фосфата, субстрата фосфорилазы, сдвигает равновесие R ⇌ T в сторону R-состояния. Конформационные различия между этими состояниями достаточно велики, что может обусловить разрушение кристаллов, если они не стабилизированы перекрестными химическими связями. Разрушение

кристалла, вызванное аллостерическим переходом, впервые описал Горовиц (Haurowitz) для оксигенирования кристаллов дезоксигемоглобина.

6. Херс (Hers H. G., Ann. Rev. Biochem., **45**, 167 (1976)] предположил, что кинетика указанных реакций обусловливает наличие лаг-периода в дефосфорилировании субъединицы B, благодаря чему распад гликогена может произойти до того, как будет инактивирована киназа фосфорилазы под действием ее фосфатазы.

Глава 17

1. а) Глицерол + 2 NAD^+ + P_i + ADP → Пируват + ATP + H_2O + 2 NADH + H^+.

   б) Глицеролкиназа и глицеролфосфат-дегидрогеназа.

2. Стеарат + ATP + 131/2 H_2O + 8 FAD + + 8 NAD^+ → 4·1/2 Ацетоацетат + 12·1/2 H^+ + + 8 $FADH_2$ + 8 FADH + AMP + 2 P.

3. а) Окисление в митохондриях, синтез в цитозоле.

   б) Ацетил-CoA при окислении, ацил переносящий белок для синтеза.

   в) FAD и NAD^+ при окислении, NADPH для синтеза

   г) L-Изомер 3-гидроксиацил-CoA при окислении. D-изомер при синтезе.

   д) От карбоксила к метилу при окислении, от метила к карбоксилу при синтезе.

   е) Ферменты синтеза жирных кислот, но не ферменты их окисления организованы в мультиферментный комплекс.

4. а) Пальмитолеат; б) линолеат; в) линолеат; г) олеат; д) олеат и е) линоленат.

5. Большей радиоактивностью обладает С-1 (см. обсуждение этого экспериментального подхода для выяснения направления синтеза полипептидной цепи в разд. 27.11).

6. а) Да.

   2 Ацетил-CoA + 3H_2O + FAD + 2NAD^+ → → Оксалоацетат + 2CoA + $FADH_2$ + + 2NADH + 4H^+.

   в) Да, потому что глюкоза может синтезироваться из оксалоацетата по пути глюконеогенеза.

Глава 18

1. а) Пируват; б) оксалоацетат; в) α-оксоглутарат; г) α-оксоизокапроат; д) фенилпируват и е) гидроксифенилпируват.

2. Аспартат + α-Оксоглутарат + GTP + ATP + + 2 H_2O + NADH + H^+ → 1/2 Глюкоза + Глутамат + CO_2 + ADP + GDP + NAD^+ + + 2 P_i.

3. Аспартат + CO_2 + NH_4^+ + 3 ATP + NAD^+ + + 4 H_2O → Оксалоацетат + Мочевина + 2 ADP + + 4 P_i + AMP + NADH + H^+.

4. а) Пометим ^{14}C углеродный атом метильной группы L-метилмалонил-CoA. Определим локализацию ^{14}C в сукцинил-CoA. Мигрирующая группа – та, которая связана с меченым атомом углерода.

   б) Пометим ^{14}C углеродный атом метильной группы L-метилмалонил-CoA и пометим ^{35}S атом серы его CoA-компонента. Перенос группы – CO—S—CoA будет внутримолекулярным, если окажется, что сукцинил-CoA содержит и ^{14}C, и ^{35}S.

   в) Протон метильной группы L-метилмалонил-CoA прямо переносится к соседнему углеродному атому.

5. Тиаминпирофосфат.

Глава 19

1. $\Delta E_0' = +0{,}28$ В и $\Delta G^{0\prime} = -12{,}9$ ккал/моль.

2. Альдолаза участвует в цикле Кальвина, тогда как трансальдолаза – в пентозофосфатном пути.

3. Концентрация 3-фосфоглицерата повысится, а концентрация рибулозо-1,5-бисфосфата снизится.

4. Концентрация 3-фосфоглицерата понизится, а концентрация рибулозо-1,5-бисфосфата повысится.

5. Фикоэритрин и фикоцианин служат антенными молекулами. Они поглощают свет в области спектра, в которой хлорофилл *a* обладает низким поглощением, и затем переносят свою энергию возбужденных электронов к хлорофиллу *a*.

6. а) Это является выражением ключевого аспекта фотосинтеза – вода расщепляется светом. Выделяющийся при фотосинтезе кислород происходит из воды.

   б) Уравнение Ван Нила для дыхания отражает тот факт, что для сгорания глюкозы потребуется поступление шести молекул H_2O. См. интересную дискуссию о природе клеточного дыхания. (Wald G., On the nature of cellular respiration, Current Aspects of Biochemical Energetics, N. O. Kaplan and E. P. Kennedy, eds., Academic Press, 1966, pp. 27–37.)

7. Добавление пиридина увеличивает способность полости тилакоидов накапливать протоны. Таким образом, большее количество протонов может протекать в темноте через ATP-синтезирующий комплекс. Обсуждение этого эксперимента см.: Avron M., Ann. Rev. Biochem., **46**, 145 (1977).

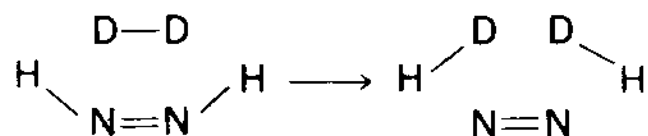
8. Дихлорфенилдиметилмочевина (DCMU) подавляет перенос электронов между коферментом Q и пластихиноном в участке, связывающем между собой фотосистемы II и I. Выделение O_2 может происходить в присутствии DCMU при условии наличия искусственного акцептора электронов, такого, как феррицианид, способного акцептировать электроны с кофермента Q.

Глава 20

1. Глицерол + 4 ATP + 3 Жирная кислота + + 4 H_2O → Триацилглицерол + ADP + + 3 AMP + 7 P_i + 4 H^+.
2. Глицерол + 3 ATP + 2 Жирная кислота + + 2 H_2O + CTP + Серин → Фосфатидилсерин + CMP + ADP + 2 AMP + 6 P_i + 3 H^+
3. а) CDP-диацилглицерол; б) CDP-этаноламин; в) Ацил-CoA; г) CDP-холин; д) UDP-глюкоза или UDP-галактоза; е) UDP-галактоза; ж) геранилпирофосфат.
4. а) и б) Метка не будет обнаруживаться нигде, так как она теряется в виде CO_2.

Глава 21

1. Глюкоза + 2 ADP + 2 P_i + 2 NAD^+ + 2 Глутамат → 2 Аланин + 2 α-Оксоглутарат + 2 ATP + + 2 NADH + H^+.
2. N_2 → NH_4 → Глутамат → Серин → Глицин → → δ-Аминолевулинат → Порфобилиноген → → Гем.
3. а) Тетрагидрофолят; б) Тетрагидрофолят; в) N^5-метилтетрагидрофолят.
4. Промежуточным продуктом реакции, возможно, является γ-глутамилфосфат.
5. Введение глицина приводит к образованию изовалерилглицина. В отличие от валериановой кислоты это соединение водорастворимо и быстро выводится из почек. См. статью: Cohn R. M., Yudkoff M., Rothman R., Segal S., New Engl. J. Med., **299**, 996 (1978).
6. Характер обмена H—D указывает, что в качестве промежуточного продукта образуется диимид. См. статью: Bulen W. A., Proc. Int. Symp. N_2 Fixation, Washington State Univ. Press, 1976.



7. Они осуществляют азотфиксацию. Вследствие отсутствия фотосистемы II в них создается бескислородная среда. Напомним, что нитрогеназа очень быстро инактивируется кислородом. Более подробное описание гетероцист можно найти в книге: Stanier R. Y., Adelberg E. A., Ingraham J. L., The Microbial World, 4th ed., Prentice-Hall, 1976, pp. 542–544. [Имеется русский перевод: Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов.– М.: Мир, 1979.]

Глава 22

1. Глюкоза + 2 ATP + 2 $NADP^+$ + H_2O → → ФРПФ + CO_2 + ADP + AMP + 2 NADPH + + H^+.
2. Глутамин + Аспартат + CO_2 + 2 ATP + + NAD^+ → Оротат + 2 ADP + 2 P_i + Глутамат + NADH + H^+.
3. а, в, г и д) ФРПФ; б) карбамоилфосфат.
4. ФРПФ и формилглицинамидрибонуклеотид.
5. dUMP + Серин + NADPH + H^+ → dTMP + + $NADP^+$ + Глицин.
6. Создается дефицит N^{10}-формилтетрагидрофолята. Сульфаниламид ингибирует синтез фолиевой кислоты, так как представляет собой аналог одного из ее предшественников – *n*-аминобензойной кислоты.
7. ФРПФ является активированным промежуточным продуктом следующих биосинтетических путей: а) при синтезе фосфорибозиламина в процессе образования пуринов de novo; б) при синтезе пуриннуклеотидов из свободных оснований (путь синтеза из готовых остатков); в) при синтезе оротидиловой кислоты в процессе образования пиримидинов; г) при синтезе рибонуклеотида никатиновой кислоты; д) при образовании фосфорибозил-ATP в ходе синтеза гистидина; е) при образовании фосфорибозилантранилата в процессе синтеза триптофана.
8. Скорее всего в результате каталитического действия малой субъединицы от глутамина отщепляется аммиак. Затем новообразованный аммиак реагирует с какой-то активированной формой CO_2, которую образует большая субъединица. То, что субъединица обладает бикарбонат-зависимой ATPазной активностью, позволяет предположить, что активированная форма – карбонилфосфат. В результате реакции этого смешанного углеродно-фосфорного ангидрида с NH_3 образуется карбамат, который затем вступает в реакцию с ATP и дает карбамоилфосфат. Подробнее этот ферментативный механизм обсуждается в книге: Walsh C., Enzymatic Reaction Mechanisms, Freeman, 1979, pp. 150–154.

Оглавление

Часть II. Генерирование и хранение метаболической энергии

Глава 11. Метаболизм: основные положения и обозначения 6

11.1. Свободная энергия – самая полезная термодинамическая функция в биохимии 6

11.2. Изменение стандартной свободной энергии реакции и его связь с константой равновесия 8

11.3. Термодинамически невыгодная реакция может быть индуцирована термодинамически выгодной реакцией 9

11.4. ATP – универсальная, энергетическая валюта в биологических системах 10

11.5. ATP постоянно образуется и потребляется 11

11.6. Структурная основа ATP, определяющая высокий потенциал переноса групп 11

11.7. Гидролиз ATP сдвигает равновесие сопряженных реакций в 10^8 раз 12

11.8. NADH и $FADH_2$ – основные переносчики электронов при окислении топливных молекул 14

11.9. NADPH главный донор электронов в восстановительном биосинтезе 15

10.10. Кофермент А как универсальный переносчик ацильных групп 16

11.11. Большинство водорастворимых витаминов являются компонентами коферментов 17

11.12. Стадии извлечения энергии из пищевых веществ 18

11.13. Процессы обмена веществ регулируются множеством различных механизмов 19

Заключение 20

Вопросы и задачи 22

Глава 12. Гликолиз 23

12.1. Номенклатура и конформация моносахаридов 24

12.2. Общий обзор ключевых структур и реакций 27

12.3. Образование фруктозо-1,6-бисфосфата из глюкозы 28

12.4. Образование глицеральдегид-3-фосфата путем расщепления и изомеризации 30

12.5. Хранение энергии: фосфорилирование, сопряженное с окислением глицеральдегид-3-фосфата 31

12.6. Образование ATP из 1,3-бисфосфоглицерата 31

12.7. Образование пирувата и генерирование второй молекулы ATP 32

12.8. Выход энергии при превращении глюкозы в пируват 32

12.9. Фосфофруктокиназа ключевой фермент в регуляции гликолиза 33

12.10. Пируват может превращаться в этанол, лактат или ацетил-кофермент А 35

12.11. Участки связывания NAD^+ очень сходны в различных дегидрогеназах 37

12.12. Глюкоза индуцирует большие конформационные изменения в гексокиназе 38

12.13. Альдолаза образует шиффово основание с дигидроксиацетонфосфатом 38

12.14. Образование тиоэфира при окислении глицеральдегид-3-фосфата 39

12.15. Арсенат, аналог фосфата, действует как разобщитель 41

12.16. Енолфосфат имеет высокий потенциал переноса группы 41

12.17. Метаболизм 2,3-бисфосфоглицерата, регулятора транспорта кислорода 42

12.18. Нарушение гликолиза в эритроцитах приводит к изменению транспорта кислорода 43

Заключение 44

Приложение. Стереохимические соотношения некоторых сахаров 46

Вопросы и задачи 48

Глава 13. Цикл трикарбоновых кислот 49

13.1. Образование ацетилкофермента А из пирувата 49

13.2. Общая характеристика цикла трикарбоновых кислот 49

13.3. Оксалоацетат конденсируется с ацетил-коферментом А с образованием цитрата 50

13.4. Цитрат изомеризуется в изоцитрат 50

13.5. Изоцитрат окисляется и декарбоксилируется в альфа-оксоглутарат 51

13.6. При окислительном декарбоксилировании альфа-оксоглутарата образуется сукцинил-CoA 51

13.7. Генерирование высокоэнергетической фосфатной связи из сукцинилкофермента А 51

13.8. Регенерирование оксалоацетата при окислении сукцината 52

13.9. Стехиометрия цикла трикарбоновых кислот 53
13.10. Пируват-дегидрогеназный комплекс – организованная система ферментов 54
13.11. Вариации на мультиферментную тему: альфа-оксоглутарат—дегидрогеназный комплекс 59
13.12. Бери-бери вызывается недостаточностью тиамина 60
13.13. Симметричные молекулы могут реагировать асимметрично 60
13.14. Стереоспецифический перенос водорода NAD^+-дегидрогеназами 62
13.15. Летальный синтез: превращение фторацетата во фторцитрат 63
13.16. Цикл трикарбоновых кислот – источник предшественников для процессов биосинтеза 64
13.17. Регуляция пируват-дегидрогеназного комплекса 64
13.18. Регуляция цикла трикарбоновых кислот 65
13.19. Открытие цикла Кребсом 66
Заключение 67
Приложение. *RS*-обозначение хиральности 69
Вопросы и задачи 70

Глава 14. Окислительное фосфорилирование 71
14.1. Окислительное фосфорилирование происходит в митохондриях 72
14.2. Окислительно-восстановительные потенциалы и изменения свободной энергии 72
14.3. Величина окислительно-восстановительного потенциала дыхательной цепи составляет 1,14 В, что соответствует 53 ккал 74
14.4. Флавин, железо-серные комплексы, хинон и гемовые группы переносят электроны от NADH к O_2 74
14.5. Сопряжение окисления и фосфорилирования осуществляется протонным градиентом 78
14.6. Протонный градиент генерируется в трех пунктах 80
14.7. Протоны выталкиваются асимметрично ориентированными трансмембранными комплексами 81
14.8. ATP синтезируется при обратном токе протонов в матрикс через протонные каналы 83
14.9. Электроны от цитоплазматического NADH поступают в митохондрии при помощи глицерофосфатного челночного механизма 84
14.10. Поступление ADP в митохондрии требует выхода ATP 86
14.11. Митохондрии содержат многочисленные транспортные системы для ионов и метаболитов 86
14.12. Полное окисление глюкозы дает 36 ATP 86
14.13. Скорость окислительного фосфорилирования определяется по потребности в ATP 87
14.14. Динитрофенол разобщает окислительное фосфорилирование путем нарушения протонного градиента 87
14.15. Трехмерная структура цитохрома *c* 88

14.16. Взаимодействие цитохрома *c* с его редуктазой и оксидазой 89
14.17. Конформация цитохрома *c* оставалась в основном постоянной в течение миллиардов лет 90
14.18. Передача протонодвижущей силы протонными градиентами – центральный мотив биоэнергетики 91
Заключение 92
Вопросы и задачи 93

Глава 15. Пентозофосфатный путь и глюконеогенез 95
15.1. Пентозофосфатный путь генерирует ATP и синтезирует пятиуглеродные сахара 95
15.2. Две молекулы NADPH генерируются при превращении глюкозо-6-фосфата в рибулозо-5-фосфат 96
15.3. Рибулозо-5-фосфат изомеризуется в рибозо-5-фосфат с образованием ендиола в качестве промежуточного продукта 96
15.4. Пентозофосфатный путь и гликолиз связаны между собой транскетолазой и трансальдолазой 96
15.5. Скорость функционирования пентозофосфатного пути регулируется концентрацией $NADP^+$ 98
15.6. Судьба глюкозо-6-фосфата зависит от потребности в NADPH, рибозо-5-фосфате и ATP 99
15.7. Активность пентозофосфатного пути в жировой ткани значительно выше, чем в мышцах 100
15.8. Тиаминпирофосфат, простетическая группа транскетолазы, переносит активированные альдегиды 101
15.9. Нарушение способности транскетолазы связывать ТПФ может быть причиной нервно-психического расстройства 102
15.10. Активированный дигидроксиацетон переносится трансальдолазой в виде шиффова основания 102
15.11. Недостаточность глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы – причина лекарственной гемолитической анемии 103
15.12. Глутатион-редуктаза переносит электроны от NADPH к окисленному глутатиону при участии FAD 105
15.13. Глюкоза может синтезироваться из неуглеводных предшественников 105
15.14. Глюконеогенез – это не обращение гликолиза 106
15.15. Биотин – мобильный переносчик акивированного CO_2 107
15.16. Пируват-карбоксилаза активируется при участии ацетил-CoA 108
15.17. Оксалоацетат переходит по челночному механизму в цитозоль и превращается в фосфоенолпируват 109
15.18. Шесть высокоэнергетических фосфатных связей расходуются при синтезе глюкозы из пирувата 109
15.19. Глюконеогенез и гликолиз регулируются реципрокно 110
15.20. Субстратные циклы амплифицируют метаболические сигналы и образование тепла 110
15.21. Лактат, образованный сокращающейся мышцей, превращается в печени в глюкозу 111

Заключение 112
Вопросы и задачи 114

Глава 16. Гликоген и обмен дисахаридов 115
16.1. Фосфорилаза катализирует фосфоролитическое расщепление гликогена до глюкозо-1-фосфата 115
16.2. Для распада гликогена необходим также фермент, разрывающий связи в местах ветвления 117
16.3. Фосфоглюкомутаза превращает глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат 118
16.4. Печень содержит глюкозо-6-фосфатазу, гидролитический фермент, отсутствующий в мышцах 119
16.5. Синтез и расщепление гликогена происходят различными путями 120
16.6. UDP-глюкоза–активированная форма глюкозы 120
16.7. Гликоген-синтаза катализирует перенос глюкозы от UDP-глюкозы к растущей цепи 121
16.8. Ветвящий фермент образует альфа-1,6-связи 121
16.9. Гликоген – очень эффективная резервная форма глюкозы 122
16.10. Циклический AMP занимает центральное положение в координированном контроле синтеза и распада гликогена 122
16.11. Фосфорилаза активируется путем фосфорилирования специфического остатка серина 123
16.12. Трехмерная структура гликоген-фосфорилазы 124
16.13. Киназа фосфорилазы также активируется путем фосфорилирования 125
16.14. Гликоген-синтаза инактивируется при фосфорилировании специфического серинового остатка 126
16.15. Каскад реакций контролирует фосфорилирование гликоген-синтазы и гликоген-фосфорилазы 126
16.16. Фосфатазы вызывают обращение регуляторных эффектов киназ 127
16.17. Каскад реакций амплифицирует гормональный сигнал 128
16.18. Обмен гликогена в печени регулирует содержание глюкозы в крови 128
16.19. Известен ряд генетически детерминированных болезней накопления гликогена 129
16.20. Крахмал – резервный полисахарид у растений 131
16.21. Мальтоза, сахароза и лактоза – широко распространенные дисахариды 132
16.22. Синтез лактозы контролируется модифицирующей субъединицей 132
16.23. Интолерантность к молоку у взрослых, обусловленная недостаточностью лактазы 133
16.24. Вступление фруктозы и галактозы на путь гликолиза 133
16.25. При отсутствии трансферазы галактоза высокотоксична 135
Заключение 135
Вопросы и задачи 136

Глава 17. Обмен жирных кислот 138
17.1. Номенклатура жирных кислот 138
17.2. Жирные кислоты варьируют по длине цепи и по степени ненасыщенности 138
17.3. Триацилглицеролы (триглицериды) – высококонцентрированные резервы энергии 139
17.4. Триацилглицеролы гидролизуются липазами, регулируемыми циклическим AMP 140
17.5. Жирные кислоты распадаются путем последовательного удаления двухуглеродных фрагментов 141
17.6. Окислению жирных кислот предшествует связывание с коферментом A 141
17.7. Карнитин переносит в митохондриальный матрикс активированные жирные кислоты с длинной цепью 142
17.8. В каждом цикле окисления жирной кислоты происходит генерирование ацетил-CoA, NADH и $FADH_2$ 143
17.9. При полном окислении пальмитата образуется 129 ATP 144
17.10. Необходимость изомеразы и эпимеразы для окисления ненасыщенных жирных кислот 146
17.11. Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуют при завершающем тиолизе пропионил-CoA 146
17.12. Образование кетоновых тел из ацетилкофермента A в условиях, когда расщепление жиров преобладает 147
17.13. Ацетоацетат – основное топливо в некоторых тканях 148
17.14. Животные неспособны превращать жирные кислоты в глюкозу 148
17.15. Синтез и распад жирных кислот идут различными путями 149
17.16. Образование малонилкофермента A – решающий шаг в синтезе жирных кислот 149
17.17. Промежуточные продукты синтеза жирных кислот присоединены к ацилпереносящему белку 151
17.18. Цикл элонгации в синтезе жирных кислот 151
17.19. Стехиометрия синтеза жирных кислот 153
17.20. Жирные кислоты синтезируются у эукариот мультиферментным комплексом 154
17.21. Цитрат переносит ацетильные группы для синтеза жирных кислот из митохондрий в цитозоль 155
17.22. Источники NADPH для синтеза жирных кислот 155
17.23. Элонгация и десатурация жирных кислот осуществляются добавочными ферментными системами 156
17.24. Регуляция синтеза жирных кислот 157
Заключение 157
Вопросы и задачи 158

Глава 18. Разрушение аминокислот и цикл мочевины 160
18.1. α-Аминогруппы превращаются в ион аммония при окислительном дезаминировании глутамата 160
18.2. Пиридоксальфосфат, простетическая группа аминотрансфераз, образует в качестве промежуточных продук-

тов шиффовы основания 161
18.3. Серин и треонин могут дезаминироваться непосредственно 163
18.4. У большинства наземных позвоночник NH_4^+ превращается в мочевину и в таком виде экскретируется 163
18.5. Цикл мочевины связан с циклом трикарбоновых кислот 165
18.6. Наследственные ферментные нарушения цикла мочевины приводят к гипераммонемии 166
18.7. Судьба атомов углерода распавшихся аминокислот 166
18.8. Семейство C_3-аминокислот: аланин, серин, и цистеин превращаются в пируват 167
18.9. Семейство C_4-аминокислот: аспартат и аспарагин превращаются в оксалоацетат 168
18.10. Семейство C_5-аминокислот: некоторые аминокислоты превращаются в α-оксоглутарат через глутамат 169
18.11. Сукцинил-кофермент A – пункт включения в цикл трикарбоновых кислот для некоторых аминокислот 169
18.12. Ферменты, содержащие в качестве простетической группы кобаламин (витамин$_{12}$), катализируют процессы перегруппировки и метилирования 170
18.13. При пернициозной анемии нарушается всасывание кобаламина 172
18.14. Известны несколько наследственных дефектов обмена метилмалонил-кофермента A 172
18.15. Лейцин распадается на ацетил-кофермент A и ацетоацетил-кофермент A 173
18.16. Фенилаланин и тирозин распадаются под действием оксигеназ на ацетоацетат и фумарат 175
18.17. Открытие Гэрродом наследственных нарушений метаболизма 176
18.18. Блокирование гидроксилирования фенилаланина может привести к резковыраженной умственной отсталости 177
Заключение 178
Вопросы и задачи 179

Глава 19. Фотосинтез 180
19.1. Открытие основного уравнения фотосинтеза 181
19.2. Хлорофиллы представляют собой фоторецепторные молекулы 183
19.3. Первичные события фотосинтеза происходят в высокоорганизованной системе мембран 184
19.4. Фотосинтетическая единица: фотоны стекаются в реакционный центр 184
19.5. Кислород, выделяющийся при фотосинтезе, происходит из воды 186
19.6. Реакция Хилла: освещенные протопласты выделяют кислород и восстанавливают искусственный акцептор электронов 187
19.7. Фотосинтез требует взаимодействия двух видов фотосистем 187
19.8. Роль двух фотосистем 187
19.9. Фотосистема I генерирует через восстановительный ферредоксин 188
19.10. Фотосистема II генерирует сильный окислитель, который расщепляет воду 190
19.11. При переносе электронов от фотосистемы II к фотосистеме I создается протонный градиент 190
19.12. При циклическом переносе электронов через фотосистему I может образовываться также ATP 191
19.13. Протонный градиент через мембрану тилакоидов запускает синтез ATP 191
19.14. Исследование пути углерода с использованием импульсной радиоактивной метки 193
19.15. CO_2 реагирует с рибулозобисфосфатом с образованием двух фосфоглицератов 194
19.16. Образование фруктозо-6-фосфата и регенерирование рибулозо-1,5-бисфосфата 195
19.17. Три ATP и два NADPH доводят CO_2 до уровня гексозы 197
19.18. Регуляция цикла Кальвина 197
19.19. У тропических растений функционирует C_4-путь, ускоряющий фотосинтез путем концентрирования CO_2 198
19.20. Гликолат – основной субстрат при фотодыхании 199
19.21. Белок пурпурных мембран галобактерий перекачивает протоны для синтеза ATP 200
Заключение 201
Вопросы и задачи 203

Часть III. Биосинтез предшественников макромолекул

Глава 20. Биосинтез мембранных липидов и стероидных гормонов 205
20.1. Фосфатидная кислота – промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов и триацилглицеролов 205
20.2. CDP-диацилглицерол – активированный промежуточный продукт синтеза фосфоацилглицеролов de novo 206
20.3. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин могут образовываться из фосфатидилсерина 207
20.4. Фосфоацилглицеролы могут также синтезироваться из готовых остатков 207
20.5. Выделено несколько специфических фосфолипаз 208
20.6. Синтез церамида – основной структурной единицы сфинголипидов 208
20.7. Ганглиозиды – богатые углеводами сфинголипиды, содержащие кислые сахара 209
20.8. Болезнь Тея – Сакса: наследуемое нарушение расщепления ганглиозидов 210
20.9. Холестерол синтезируется из ацетил-кофермента A 212
20.10. Мевалонат и сквален – промежуточные продукты синтеза холестерола 212

20.11. Синтез изопентенилпирофосфата – активированного промежуточного продукта при образовании холестерола 213
20.12. Синтез сквалена из изопентенилпирофосфата 214
20.13. 2,3-оксид сквалена циклизуется с образованием ланостерола, который в свою очередь превращается в холестерол 214
20.14. Желчные кислоты, облегчающие переваривание липидов, образуются из холестерола 215
20.15. Синтез холестерола в печени подавляется холестеролом, поступающим с пищей 216
20.16. Холестерол и другие липиды переносятся к органам-мишеням с помощью различных липопротеинов 218
20.17. Рецепторы липопротеинов низкой плотности играют ключевую роль в регуляции метаболизма холестерола 218
20.18. Отсутствие рецепторов ЛНП приводит к гиперхолестеролемии и преждевременному атеросклерозу 219
20.19. Номенклатура стероидов 220
20.20. Стероидные гормоны образуются из холестерола 221
20.21. Стероиды гидроксилируются под действием монооксигеназ, использующих NADPH и кислород 222
20.22. Прегненолон образуется из холестерола путем отщепления боковой цепи 222
20.23. Синтез прогестерона и кортикоидов 223
20.24. Синтез андрогенов и эстрогенов 223
20.25. Недостаточная активность 21-гидроксилазы приводит к вирилизму и увеличению надпочечников 224
20.26. Витамин D образуется из холестерола под действием света 225
20.27. При соединении пятиуглеродных элементов образуются самые разнообразные молекулы 226
Заключение 227
Вопросы и задачи 229

Глава 21. Биосинтез аминокислот и гема 230
21.1. Микроорганизмы используют ATP и сильный восстановитель для превращения N_2 и NH_4 230
21.2. NH_4^+ включается в аминокислоты через глугамат и глутамин 232
21.3. Аминокислоты синтезируются из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот и других важных метаболитов 233
21.4. Глутамат – предшественник глутамина и пролина 234
21.5. Серин синтезируется из 3-фосфоглицерата 235
21.6. Тетрагидрофолят переносит активированные одноуглеродные фрагменты с различной степенью окисления 235
21.7. S-аденозилметионин – основной донор метильных групп 237
21.8. Цистеин синтезируется из серина и гомоцистеина 239
21.9. Шикимат и хоризмат – промежуточные продукты биосинтеза ароматических аминокислот 239
21.10. Гистидин синтезируется из ATP, ФРПФ и глутамина 242
21.11. Биосинтез аминокислот регулируется ингибированием конечным продуктом 242
21.12. Активность глутамин-синтетазы регулируется путем аденилирования 245
21.13. Аминокислоты – предшественники множества других биомолекул 247
21.14. Профирины синтезируются из глицина и сукцинил-CoA 248
21.15. При некоторых наследственных нарушениях метаболизма порфиринов происходит их накопление 250
21.16. Биливердин и билирубин – промежуточные продукты распада гема 251
Заключение 252
Вопросы и задачи 254

Глава 22. Биосинтез нуклеотидов 255
22.1. Номенклатура оснований, нуклеозидов и нуклеотидов 255
22.2. Пуриновое кольцо синтезируется из аминокислот, производных тетрагидрофолята и CO_2 257
22.3. Фосфорибозилпирофосфат – донор рибозофосфатного остатка нуклеотидов 257
22.4. Пуриновое кольцо присоединяется к рибозофосфату во время его сборки 258
22.5. AMP и GMP образуются из IMP 259
22.6. Пуриновые основания могут использоваться повторно с помощью реакций синтеза из готовых остатков с участием ФРПФ 261
22.7. AMP и GMP – ретроингибиторы биосинтеза пуриновых нуклеотидов 261
22.8. Пиримидиновое кольцо синтезируется из карбамоилфосфата и аспартата 262
22.9. К оротату присоединяется рибозофосфатный остаток ФРПФ 262
22.10. Первые три фермента биосинтеза пиримидинов синтезируются в виде одной полипептидной цепи 263
22.11. Нуклеозидмоно-, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты способны к взаимопревращениям 263
22.12. CTP образуется путем аминирования UTP 264
22.13. Биосинтез пиримидиннуклеотидов регулируется ингибированием по принципу обратной связи 264
22.14. Аспартат-транскарбамоилаза состоит из отдельных каталитической и регуляторной субъединиц 265
22.15. Дезоксирибонуклеотиды синтезируются путем восстановления рибонуклеозиддифосфатов 266
22.16. Дезокситимидилат образуется путем метилирования дезоксиуридилата 268
22.17. Некоторые противораковые препараты блокируют синтез дезокситимидилата 269
22.18. ATP – предшественник NAD^+, FAD и кофермента A 270
22.19. В организме человека пурины распадаются до мо-

чевой кислоты 273
22.20. У некоторых организмов происходит дальнейший распад мочевой кислоты 273
22.21. Птицы и наземные рептилии выделяют мочевую кислоту вместо мочевины, чтобы сохранить воду 274
22.22. Распад пиримидинов 274
22.23. Избыточное образование мочевой кислоты - причина подагры 274
22.24. Синдром Леша - Нихана: членовредительство, умственное отставание и избыточное образование мочевой кислоты 276
Заключение 277
Вопросы и задачи 279

Глава 23. Интеграция метаболизма 280
23.1. Стратегия метаболизма: основные положения 280
23.2. Повторяющиеся мотивы в механизмах регуляции метаболизма 282
23.3. Основные метаболические пути и регуляторные этапы 284
23.4. Ключевые соединения: глюкозо-6-фосфат, пируват и ацетил-СоА 286
23.5. Метаболические особенности основных органов 288
23.6. Гормональные регуляторы энергетического метаболизма 291
23.7. Печень выполняет роль буфера в регуляции содержания глюкозы в крови 292
23.8. Адаптация метаболизма к продолжительному голоданию: снижение распада белков 293
23.9. Огромные запасы жира позволяют перелетным птицам покрывать большие расстояния 295
Заключение 296
Ответы на вопросы и задачи 299